

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA



**“CARACTERIZACIÓN CINÉTICO-MOLECULAR DE
MICROORGANISMOS EN MOSTOS DE MEZCAL”**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA

PRESENTA:

I.B.Q. FRANCISCO JAVIER DE LA TORRE GONZÁLEZ

REYNOSA, TAMAULIPAS

OCTUBRE DEL 2010

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA



**“CARACTERIZACIÓN CINÉTICO-MOLECULAR DE
MICROORGANISMOS EN MOSTOS DE MEZCAL”**

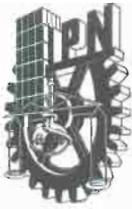
TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA

PRESENTA:

I.B.Q. FRANCISCO JAVIER DE LA TORRE GONZÁLEZ

REYNOSA, TAMAULIPAS

OCTUBRE DEL 2010



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Reynosa, Tam. siendo las 12:00 horas del día 28 del mes de Octubre del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CBG para examinar la tesis titulada:
Caracterización cinético-molecular de microorganismos en mostos de mezcal.

Presentada por el alumno:

De la Torre
Apellido paterno

González
Apellido materno

Francisco Javier
Nombre(s)

Con registro:

B	0	8	1	2	2	5
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director(a) de tesis

Dra. Claudia Patricia Larralde Corona

Dr. José Alberto Narváez Zapata

Dra. Ana María Sifuentes Rincón

Dr. Juan Manuel González Prieto

M.C. Erick de Jesús De Luna
Santillana

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dra. Ninfa María Rosas García



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Reynosa, Tam., el día 28 del mes Octubre del año 2010, el (la) que suscribe Francisco Javier De la Torre González alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica con número de registro B081225, adscrito a Centro de Biotecnología Genómica, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Claudia Patricia Larralde Corona y cede los derechos del trabajo intitulado "Caracterización cinético-molecular de microorganismos en mostos de mezcal", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección Bld. del Maestro esq. con Elías Piña S/N Col. Narciso Mendoza, C.P. 88710 Cd. Reynosa, Tamaulipas, México Tels. 01-899 9243627, 9251656. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Francisco Javier De la Torre González
Nombre y firma

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Industrial del Centro de Biotecnología Genómica - Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Claudia Patricia Larralde Corona, y fue financiado por los proyectos CONACyT Básica2006-57576 y por el SIP2008-0597 y SIP2009-0613 del Instituto Politécnico Nacional.

ÍNDICE

Sección	Página
ABREVIATURAS	X
DEDICATORIA	XI
AGRADECIMIENTOS	XII
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. ANTECEDENTES	4
II.1. La fermentación alcohólica	4
II.2. El estrés por altas concentraciones de etanol	7
II.3. Sucesión de poblaciones microbianas durante la fermentación alcohólica.....	8
II.3.1. Metodologías de estudio de las sucesiones microbianas.....	11
II.3.2. Técnicas clásicas para el estudio de sucesiones microbianas.....	11
II.4. Técnicas moleculares para el estudio de sucesiones microbianas.....	12
II.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	12
II.4.2. Electroforesis en campo pulsante (PFGE).	14
II.4.3. Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE).	14
II.4.4. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP).	14
II.4.5. Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP).	15
II.4.6. ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD).	15
II.4.7. Hibridación in situ con fluorescencia (FISH).	16
II.4.8. Análisis automatizado de los espaciadores intergénicos (ARISA).	16
II.5. El mezcal	21
II.5.1. Proceso de elaboración del mezcal	21
II.6. La microbiología del mezcal	26
III. JUSTIFICACIÓN	30

IV. HIPÓTESIS	31
V. OBJETIVOS	31
V.1. Objetivo general	31
V.1.1. Objetivos particulares.....	31
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	32
VI.1. Microorganismos	32
VI.2. Extracción de ADN.....	32
VI.3. Extracción de ADN de cultivos mixtos (ADN metagenómico).....	33
VI.3.1. Amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 por PCR.....	34
VI.3.2. Amplificación de la región 26S por PCR.....	35
VI.3.3. Electroforesis en gel de agarosa.....	35
VI.3.4. Polimorfismo de Conformación de Cadena Sencilla (SSCP).....	36
VI.3.5. Secuenciación de la región ITS y 26S.....	37
VI.4. Medios de cultivo.....	38
VI.4.1. Medio de cultivo sintético	39
VI.4.2. Medio de mosto de agave.....	40
VI.5. Determinación de la productividad de levaduras por HPLC	40
VI.6. Cuantificación de biomasa por peso seco	40
VI.7. Diseño de sondas y estandarización de la técnica Hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	41
VI.7.1 Hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH).....	42
VI.7.2. Microscopia de epifluorescencia	43
VI.8. Análisis automatizado de los espacios intergénicos del rRNA (ARISA) y su estandarización en muestras de levaduras.....	44
VI.9. Análisis bioinformático.....	46
VII. RESULTADOS	47
VII.1. Elección de las levaduras de estudio	47
VII.2. Extracción y amplificación de ADN	47
VII.3. Diseño de sondas y estandarización del FISH.....	52
VII.4. Cinética de la fermentación en medio sintético.....	58

VII.4.1. Caracterización de la dinámica poblacional en medio sintético	60
VII.4.2. Detección de las levaduras durante la fermentación mediante la técnica ARISA en medio sintético	63
VII.5. Cinética de la fermentación en medio de mosto.....	66
VII.5.1. Caracterización de la dinámica poblacional en medio de mosto	69
VII.5.2. Detección de las levaduras durante la fermentación mediante la técnica ARISA en medio de mosto.....	73
VIII. DISCUSIÓN	78
VIII.1. Cinética de la fermentación en medio sintético	79
VIII.1.1. Seguimiento de la dinámica poblacional durante la fermentación en medio sintético.....	80
VIII.2. Cinética de la fermentación en el medio de mosto.....	80
VIII.2.1. Seguimiento de la dinámica poblacional durante la fermentación en medio de mosto	81
VIII.3. Identificación molecular de levaduras en la fermentación mediante la técnica de ARISA	82
VIII.4. Seguimiento de la dinámica poblacional de las levaduras durante la fermentación mediante la técnica de FISH	85
IX. CONCLUSIONES.....	87
X. RECOMENDACIONES	89
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	90
APÉNDICES.....	97
GLOSARIO.....	126

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Balance estequiométrico de la fermentación alcohólica	5
Figura 2. Esquema de las vías metabólicas del catabolismo de la trehalosa, glucosa y glucógeno, mostrando en ella las diferentes etapas que llevan a la producción de etanol, glicerol y acetato (tomado de Biosca <i>et al.</i> , 2002).	6
Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa donde se muestra la amplificación así como la restricción de algunas levaduras, filas A, B, I y J, <i>C. stellata</i> ; carriles C, D, K y L, <i>M. pulcherrima</i> ; carriles e, f, m y n, <i>K. apiculata</i> ; carriles G, H, O y P, <i>S. pombe</i> , M: marcador de peso molecular de ADN, de 100 pb. (Tomada de Capece <i>et al.</i> 2003).....	13
Figura 4. Proceso de jimado. (Fotografía e información tomada de la revista Fundación Produce Oaxaca, 2007)	22
Figura 5. Cocción tradicional de las piñas de <i>Agave</i> spp en hornos de piedra en el suelo, Municipio de San Carlos (Tamaulipas).	23
Figura 6. Proceso de molienda de las piñas cocidas en un trapiche tradicional de madera, con tracción animal (Municipio de San Nicolás, Tamaulipas).	24
Figura 7. Representación grafica de las regiones amplificadas en el análisis ARISA en bacterias. Imagen tomada de Jones <i>et al.</i> (2007).....	44
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de la extracción de ADN de las levaduras de estudio.	47
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa de la extracción de ADN del cultivo mixto en medio sintético. TA es el inóculo de 1:1:1, TB el inóculo de 0.1:1:1 de <i>S. cerevisiae</i> , <i>K. marxianus</i> y <i>T. delbrueckii</i> acompañados del tiempo de toma de muestra.	48
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de la extracción del ADN del cultivo mixto del medio de mosto. Donde TA es el inóculo de 1:1:1, TB el inóculo de 0.1:1:1 de <i>S. cerevisiae</i> (<i>Sc</i>), <i>K. marxianus</i> (<i>Km</i>) y <i>T. delbrueckii</i> (<i>Td</i>) acompañados del tiempo de toma de muestra (antecedido por la letra T).	48
Figura 11. Amplificación de las regiones 26S e ITS de las levaduras de estudio. (A) Iniciadores NL1y NL4 (B) iniciadores ITS1 e ITS4. Marcador de peso molecular, muestras de levaduras, (+) control positivo, (-) control negativo.....	49

Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación de las regiones (A) ITS y (B) 26S de medio sintético. Donde TA es el inóculo de 1:1:1, TB el inóculo de 0.1:1:1 de <i>S. cerevisiae</i> , <i>K. marxianus</i> y <i>T. delbrueckii</i> acompañados del tiempo de toma de muestra.....	50
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación de las regiones (A) ITS y (B) 26S de las levaduras presentes en la fermentación. Donde TA es el inóculo de 1:1:1, TB el inóculo de 0.1:1:1 de <i>S. cerevisiae</i> (<i>Sc</i>), <i>K. marxianus</i> (<i>Km</i>) y <i>T. delbrueckii</i> (<i>Td</i>) acompañados del tiempo de toma de muestra.	50
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa de la mezcla de los productos de PCR del 26S e ITS de las levaduras de estudio.....	51
Figura 15. Análisis del polimorfismo de las levaduras utilizadas por medio de la técnica SSCP usando los oligonucleótidos ITS1 ITS4 y NL1 NL4. Las flechas indican la posición de las bandas ribosomales.	52
Figura 16. Alineamiento de la región conservada en las secuencias del 26S de 15 aislamientos de <i>S. cerevisiae</i> obtenidas de mostos de mezcal con secuencias reportadas en el NCBI.....	53
Figura 17. Alineamiento de la región conservada de las secuencias 26S de 5 aislamientos de <i>T. delbrueckii</i> obtenidos de mostos de mezcal con secuencias del NCBI.	53
Figura 18. Alineamiento de la región conservada en las secuencias del 26S de 11 aislamientos de <i>K. marxianus</i> obtenidas de mostos de mezcal con secuencias reportadas en el NCBI.....	54
Figura 19. Microfotografías de las diferentes concentraciones de formamida utilizadas para la estandarización de FISH con las sondas reportadas DAPI, ScX y EUK. Objetivo 100X.	55
Figura 20. Microfotografías y porcentaje de detección calculado de la mezcla entre Sc 3Y8 y Td 1AN5, utilizando la sonda específica para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Objetivo 100X.....	56
Figura 21. Microfotografías y porcentaje de detección calculado de la mezcla entre Td 1AN5 y Sc 3Y8 y utilizando la sonda específica para <i>Torulaspota delbrueckii</i> . Objetivo 100X.....	57
Figura 22. Cinética de fermentación en medio sintético de cultivo con inóculo mixto de <i>S. cerevisiae</i> , <i>K. marxianus</i> y <i>T. delbrueckii</i> mezclados a una relación inicial de: (A) 1: 1: 1, y (B) 0.1: 1: 1. Donde -◇- Glucosa, - - Fructosa, Δ Glicerol, X Etanol.	59

Figura 23. Dinámica poblacional durante la fermentación en medio sintético con inóculo en mezcla 1:1:1 de <i>S. cerevisiae</i> , <i>K. marxianus</i> y <i>T. delbrueckii</i> . ▲-Km, ■-Sc, ◆-DAPI, X-Td, •-cel mL ⁻¹ . En la parte inferior microfotografías que muestran el seguimiento celular conforme avanza el tiempo de fermentación.....	61
Figura 24. Dinámica poblacional durante la fermentación en medio sintético con inóculo en mezcla 0.1 de <i>S. cerevisiae</i> , y 1:1 de <i>K. marxianus</i> y <i>T. delbrueckii</i> . ▲-Km, ■-Sc, ◆-DAPI, X-Td, •-cel mL ⁻¹ . En la parte inferior microfotografías que muestran el seguimiento celular conforme avanza el tiempo de fermentación.....	62
Figura 25. Cinética de fermentación en medio de mosto con inóculo mixto de <i>S. cerevisiae</i> , <i>K. marxianus</i> y <i>T. delbrueckii</i> mezclados a una relación inicial de: (A) 1: 1: 1, y (B) 0.1:1:1. Donde: -◇- Glucosa, - - Fructosa, y -X- Etanol.	66
Figura 26. Cinética de fermentación individuales en medio de mosto de cada levadura analizada: (A) <i>S. cerevisiae</i> , (B) <i>K. marxianus</i> , (C) <i>T. delbrueckii</i> . Con un inóculo de 1X10 ⁴ cel mL ⁻¹ para las 3 especies. Donde: -◇- Glucosa, - - Fructosa, y -X- Etanol.	68
Figura 27. Dinámica poblacional durante la fermentación en medio de mosto con inóculo en mezcla de 1:1:1 de <i>S. cerevisiae</i> , <i>K. marxianus</i> y <i>T. delbrueckii</i> . ▲Km, ■ Sc, ◆ DAPI, X Td, •-cel mL ⁻¹ . En la parte inferior microfotografías que muestran el seguimiento celular conforme avanza el tiempo de fermentación.....	70
Figura 28. Dinámica poblacional durante la fermentación en medio de mosto con inóculo en mezcla de 0.1 de <i>S. cerevisiae</i> , y 1:1 de <i>K. marxianus</i> y <i>T. delbrueckii</i> . ▲Km, ■ Sc, ◆ DAPI, X Td, •-cel mL ⁻¹ . En la parte inferior microfotografías que muestran el seguimiento celular conforme avanza el tiempo de fermentación.....	71
Figura 29. Seguimiento poblacional durante la fermentación en medio de mosto de cada levadura cultivada de manera individual y con la misma concentración inicial de inóculo. ▲Km, ■ Sc, ◆ DAPI, X Td, •-cel mL ⁻¹	73

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
Cuadro 1. Técnicas moleculares utilizadas para el análisis de poblaciones microbianas en fermentaciones alcohólicas.....	19
Cuadro 2. Tecnología empleada en las tres diferentes formas de elaboración del mezcal.....	25
Cuadro 3. Producción máxima de etanol en el medio de mosto a las 60 horas de las especies: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (S.c), <i>Kluyveromyces marxianus</i> (K.m), y <i>Torulaspota delbrueckii</i> (T.d) del cepario de levaduras del mezcal LBI.....	28
Cuadro 4. Mezcla de reacción utilizada para la amplificación de la región ITS.....	34
Cuadro 5. Mezcla de reacción utilizada para la amplificación de la región 26S.	35
Cuadro 6. Reactivos empleados para la elaboración del gel de acrilamida al 10%	36
Cuadro 7. Reacción para secuenciación.....	38
Cuadro 8. Medio de cultivo sintético	39
Cuadro 9. Secuencias de la sondas de la región 26S rRNA D1/D2 especie-especificas de levaduras presentes en la fermentación alcohólica. Reportadas por Xufre <i>et al.</i> (2006).....	42
Cuadro 10. Mezcla de reacción utilizada para ARISA.	45
Cuadro 11. Tamaños de las secuencias de la región 26S e ITS para los aislamientos de levaduras	45
Cuadro 12. Secuencias de las sondas diseñadas en este trabajo para de las especies de levaduras probadas.....	54
Cuadro 13. Parámetros cinéticos de la fermentación llevada a cabo con medio sintético a dos inóculos diferentes de <i>S. cerevisiae</i> : <i>K. marxianus</i> : <i>T.delbrueckii</i>	60
Cuadro 14. Detección de especies en medio sintético mediante la técnica ARISA, inóculo <i>S. cerevisiae</i> , <i>K. marxianus</i> y <i>T. delbrueckii</i> en mezcla 1 : 1 : 1.	64
Cuadro 15. Detección de especies en medio sintético mediante la técnica ARISA, inóculo <i>S. cerevisiae</i> , <i>K. marxianus</i> y <i>T. delbrueckii</i> en mezcla 0.1 : 1 : 1.	65

Cuadro 16. Parámetros cinéticos de la fermentación llevada a cabo en medio de mosto a dos inóculos diferentes de <i>S. cerevisiae</i> : <i>K. marxianus</i> : <i>T. delbrueckii</i>	67
Cuadro 17. Parámetros cinéticos de la fermentación llevada a cabo en medio de mosto por las levaduras de manera individual.....	69
Cuadro 18. Detección de las especies <i>S. cerevisiae</i> , <i>K. marxianus</i> y <i>T. delbrueckii</i> en medio de mosto mediante la técnica ARISA, inóculo en mezcla 1:1:1.....	75
Cuadro 19. Detección de las especies <i>S. cerevisiae</i> , <i>K. marxianus</i> y <i>T. delbrueckii</i> en medio de mosto mediante la técnica ARISA, inóculo en mezcla 0.1:1:1.....	76
Cuadro 20. Detección de las especies <i>S. cerevisiae</i> , <i>K. marxianus</i> y <i>T. delbrueckii</i> en medio de mosto mediante la técnica ARISA de manera individual	77

ÍNDICE DE APÉNDICES

Apéndice	Página
Apéndice 1. Imágenes de las levaduras utilizadas en este estudio del tratamiento con formamida.....	97
Apéndice 2. Imágenes de las levaduras utilizadas en este estudio de la prueba de restos orgánicos en el medio de mosto. Objetivo 100X.	101
Apéndice 3. Imágenes de las levaduras utilizadas en este estudio del seguimiento de la dinámica poblacional utilizando FISH en medio sintético.	102
Apéndice 4. Imágenes de las levaduras utilizadas en este estudio del seguimiento de la dinámica poblacional utilizando FISH en medio de mosto.	108
Apéndice 5. Fórmulas utilizadas en este estudio para el cálculo de los parámetros de crecimiento y cinéticos de cultivos.....	114
Apéndice 6. Conteo en placa y cámara de Neubauer en medio de mosto	116
Apéndice 7. Conteo en placa y cámara de Neubauer en medio sintético	117
Apéndice 8. Electroferogramas obtenidos de las levaduras utilizadas en este estudio durante el seguimiento de la dinámica poblacional utilizando ARISA en medio sintético.....	118
Apéndice 9. Electroferogramas obtenidos de las levaduras utilizadas en este estudio durante el seguimiento de la dinámica poblacional utilizando ARISA en medio de mosto.....	122
Apéndice 10. Cromatograma de HPLC del medio de mosto.....	125

ABREVIATURAS

µg	Microgramos
µL	Microlitro
µM	Micromolar
A ₂₆₀	Absorbancia a 260 nm
A ₂₈₀	Absorbancia a 280 nm
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARISA	Análisis automatizado de los espaciadores intergenicos
DAPI	4',6-diamidino-2-fenil indol dilactato
dNTP	Deoxinucleótido trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FAM	Fluorocromo
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i>
HEX	Fluorocromo
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
mg	Miligramos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
nm	Nanómetros
°C	Grados centígrados
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Agar papa dextrosa
rpm	Revoluciones por minuto
SSCP	Polimorfismo de Conformación de Cadena Sencilla
TAE	Tris Acetato de EDTA
Taq	ADN polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris Borato de EDTA
TGY	Tripton-Glucosa-Extracto de levadura
YEPD	Extracto de levadura-Peptona-Glucosa

DEDICATORIA

A mis padres que siempre han estado conmigo en las buenas y en las malas por saber ser pacientes, responsables con mi persona y darme un buen ejemplo en su trayectoria profesional como en la vida misma, pero sobre todo por darme la vida, su amor así como su apoyo incondicional por eso y todo es que quiero agradecerles todo lo que me han dado con mis logros profesionales.

Dedico también este logro alcanzado a mi abuelo quien siempre creyó que nunca pararía hasta alcanzar lo que en la vida me he propuesto aunque con ello consiguiera el volverme loco.

Gracias.

AGRADECIMIENTOS

Inicialmente a Dios por darme el tiempo y licencia de alcanzar este logro y con ello dar cumplimiento a una más de mis metas profesionales.

Es también de agradecer a la Dra. Patricia Larralde Corona quien creyó en mí y por estar siempre al pendiente al igual que ayudándome en cada etapa de la elaboración de este trabajo que de esta manera concluye. A mi comité revisor de tesis la Dra. Ana María Sifuentes, el Dr. José Alberto Narváez Zapata, Dr. Juan Manuel González Prieto y el M.C. Erick de Luna Santillana por sus críticas constructivas, apoyo, e ideas que hicieron posible la culminación de este estudio.

A la M.C. Amanda Alejandra Oliva Hernández por su ayuda, comprensión apoyo así como sus regaños (no necesarios, bueno a veces) durante mi estancia y desarrollo del trabajo de laboratorio. A mi laboratorio de Biotecnología Industrial única y especialmente al M.C. Leandro Paramo y Érika por su amistad, compañía y disponibilidad de tiempo de una manera tan amable que siempre tuve durante mi estancia en el CBG.

A mis compañeros de generación 2008-2010 Mi vieja (Salvador Castell) y Poncho navajas (Alfonso Garza) por su amistad y apoyo durante estos dos años, así como el compartir de fiestas, consejos y demás vivencias pasadas. A la familia BEBO's que aún no siendo de mi generación formaron parte de ella con sus vivencias pláticas, amistad y apoyo.

Un agradecimiento al Laboratorio de Servicios especialmente al Dr. Víctor Moreno y al M.C. Israel por facilitarme los aparatos como el HPLC y el secuenciador, con los que se logró obtener algunos de los resultados de mi trabajo, pero sobre todo por esa amistad y apoyo brindado. Y a cada una de las personas miembros de este plantel así como personal académico, administrativo y manual que me atendieron amablemente durante mi estancia en este plantel y que con ello permitieron una estancia más amena.

Agradezco el apoyo económico de CONACyT tanto por la Beca de Estudios nacional, como por la beca mixta otorgada para poder realizar una estancia con el Dr. Dittmar Hahn (Texas State University at San Marcos, EEUU) para el aprendizaje de la técnica de FISH.

Agradezco finalmente el apoyo de la SIP por la Beca de Terminación y el apoyo complementario PIFI asociado a los proyectos SIP2009-0613 y SIP2010-0928 del Instituto Politécnico Nacional.

¡Sinceramente muchas gracias a todos!

RESUMEN

El mezcal es considerado una bebida alcohólica artesanal mexicana cuya elaboración tiene denominación de origen en varios estados de la república mexicana, incluyendo Tamaulipas. Aunque se conoce que las levaduras son responsables de la fermentación de los mostos de *Agave* spp, y gracias a ellas se produce la biotransformación de los azúcares presentes en etanol y otros compuestos que le confieren el sabor característico a la bebida, se requiere ampliar el conocimiento al respecto de la microbiota involucrada en la fermentación del mezcal. En este trabajo se estudió la dinámica poblacional de las principales especies de levaduras presentes durante la fermentación en medio sintético y medio de mosto, donde se analizan la cinética de metabolitos y sucesión poblacional de cultivos mixtos de aislamientos nativos de *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, y *Torulaspota delbrueckii*. El análisis de las fermentaciones con la técnica ARISA (análisis automatizado de los espaciadores intergénicos) permitió obtener patrones diferenciales en los electroferogramas de las 3 especies, representados por picos de diferente tamaño y fluorescencia, demostrando con ello que la técnica puede ser utilizada tanto como un sistema de identificación y etiquetamiento molecular de las especies, así como para verificar que la población deseada se encuentre presente en la fermentación. El análisis de poblaciones utilizando la técnica de FISH (hibridación con fluorescencia *in situ*) permitió cuantificar la concentración celular de cada una de las especies estudiadas durante toda la fermentación, y con la cual se observó que en las primeras horas de cultivo el crecimiento de las 3 especies es similar, sin embargo, después de 24 horas, *S. cerevisiae* comienza a predominar, mientras que las otras 2 especies permanecen viables aunque en baja concentración hasta el final de la fermentación. Este trabajo constituye el primer reporte de caracterización molecular y su relación con la productividad de cultivos mixtos de las tres principales especies levaduras involucradas en la elaboración del mezcal tamaulipeco con el uso de las técnicas FISH y ARISA.

ABSTRACT

Mezcal is a traditional mexican alcoholic beverage with denomination of origin in several states of the mexican republic, including Tamaulipas. Although it is well known that yeasts are responsible for fermentation of the must of *Agave* spp, biotransforming sugars into ethanol and other compounds that provide the beverage's characteristic flavor, basic knowledge is still needed concerning native microbiota involved in the fermentation of mezcal. In this study, the population dynamics of the main yeast species present during fermentation in two model media, synthetic or based on agave must, were characterized, analyzing the metabolite's kinetics and the sucesion of populations of mixed cultures of native isolates of *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* and *Torulaspora delbrueckii*. The analysis using the ARISA technique allowed us to obtain differential electropherograms for the three yeast species, represented by peaks of different size and flourescence, thereby showing that the technique can be used as a system of identification and molecular species labeling and in the same way can be used in monitoring each during fermentation to verify that the target population is present in the process. The population dynamics analysis by means of the FISH technique, used to quantify the concentration of each of the studied species along all the fermentation, showed that, at the initial stage of fermentation all the three yeast species have a similar growth trend, however, after 24 h the yeast *S. cerevisiae* predominates, while the other two species do not disappear but remain viable and in low concentration through the end of the fermentation. This work constitutes the first report on global molecular characterization and its productivity relationship of a mixed culture of the three main yeasts species involved in the fermentation of mezcal using ARISA and FISH techniques.

I. INTRODUCCIÓN

El mezcal es una bebida alcohólica proveniente del maguey. Su origen es incierto, sin embargo es considerado la primer bebida destilada que surgió al mundo después de la conquista española en tierras americanas, por lo que es emblemática del mestizaje que caracteriza al pueblo de México, ya que es el resultado de la conjugación de las antiguas técnicas indígenas de aprovechamiento del agave y la tecnología europea del destilado. En los últimos diez años el mezcal ha alcanzado un reconocimiento nacional e internacional, siendo así la segunda bebida alcohólica más consumida en nuestro país después del tequila. El mezcal es producido en varios estados de la Republica Mexicana, en los cuales la materia prima, el *Agave* spp, crece en forma silvestre, por ejemplo *Agave angustifolia*, *A. potatorum* y *A. salmiana*, entre otras especies. Entre los estados productores más importantes se destacan: Oaxaca, Jalisco, Chihuahua, San Luis Potosí, Zacatecas, Guerrero, Durango y Tamaulipas. El proceso central para la elaboración del mezcal es la fermentación alcohólica, es decir, la biotransformación de los azúcares en etanol, la cual suele ser llevada a cabo de una manera muy artesanal e involucra una gran diversidad de microorganismos, entre los cuales la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es la más importante debido a su alta tolerancia a grandes concentraciones de etanol. Aunque la producción de etanol es atribuida a *S. cerevisiae*, la gran microbiota nativa de bacterias y levaduras le confieren rasgos organolépticos característicos al mezcal de cada región. Sin embargo, existe muy poca información en cuanto al papel de estos microorganismos en la elaboración de esta bebida, y es por estos motivos, surge la importancia de caracterizar la presencia de la microbiota nativa durante la fermentación alcohólica, por ser determinante de la calidad no solo del mezcal tamaulipeco.

II. ANTECEDENTES

En su sentido más amplio, una fermentación es el proceso de cambios químicos en un sustrato orgánico causados por enzimas, las cuales generalmente se encuentran en microorganismos vivos. Los conocimientos sobre dicho proceso ha sido atesorado desde la antigüedad por grandes civilizaciones, como la egipcia y la asiria quienes la emplearon para la producción de bebidas alcohólicas; o como la azteca o china quienes le dieron uso en la producción y obtención de productos alimenticios como salsas y bebidas fermentadas (Ostergaard *et al.*, 2000).

Actualmente, este proceso ha alcanzado el grado modernizado gracias a la aparición de técnicas que permiten el uso de organismos puros de células vegetales y animales, así como otros tipos de cultivos microbianos, permitiendo con ello su uso en la industria donde se destaca la panificadora, la de bebidas alcohólicas, la farmacéutica con la producción de vacunas y medicamentos, además de la industria bioquímica, la cual es encargada de producir ácidos orgánicos, aldehídos, y alcoholes.

II.1. La fermentación alcohólica

El proceso mediante el cual el azúcar de un jugo de uva era descompuesto por células vivas de levaduras en alcohol y dióxido de carbono, fue descrito inicialmente por el francés Louis Pasteur, quien observó que el azúcar era descompuesto en ausencia de oxígeno, que en el jugo se caracterizaba por un comportamiento “de ebullición” (*fervere* en latín) causado por la liberación de dióxido de carbono por las levaduras presentes en el mosto azucarado, mientras que la células de levaduras se mantenían con vida e incluso comenzaban a propagarse, proceso mejor conocido actualmente como fermentación alcohólica.

La fermentación en su sentido más amplio es la desasimilación anaeróbica de compuestos orgánicos llevada a cabo por microorganismos u otras células; además de ser considerada como un grupo de reacciones bioquímicas mediante las cuales una sustancia orgánica es

transformada en otras por acción de ciertos organismos, principalmente levaduras (Sánchez *et al.*, 2005) que llegan a producir un desprendimiento gaseoso y un efecto calorífico (Fig. 1). Son conocidas centenares de levaduras, bacterias y mohos que producen alcohol, sin embargo solo algunas especies de levaduras son utilizadas de manera industrial siendo éstas elegidas por la velocidad de fermentación que pueden proporcionar y su tolerancia a las concentraciones de azúcar y alcohol que existen durante dicho proceso.



Figura 1. Balance estequiométrico de la fermentación alcohólica

Dentro de las levaduras comúnmente utilizadas esta *Saccharomyces cerevisiae* que ha sido empleada por más de 8000 años dentro de la producción de bebidas alcohólicas empezando con la cerveza, y posteriormente el vino (Fleet *et al.*, 1984). En éste último, *S. cerevisiae* produce, durante la fermentación además de etanol, ciertos compuestos de bajo peso molecular como ácidos orgánicos y ésteres entre muchos otros, que tienen gran impacto en la calidad del producto, así mismo es posible llegar a observar la formación de alcoholes aromáticos o alifáticos que de igual manera que los compuestos de bajo peso molecular antes mencionados, proporcionan cualidades organolépticas únicas en cada producto final de la fermentación (Hazelwood *et al.*, 2008). El proceso de reacciones bioquímicas globales que conducen a la producción de etanol se muestra a continuación en la figura 2. Puede observarse que existe competencia cinética entre las reacciones de producción de etanol y glicerol dado que estas tienen sustrato común, la fructosa 1,6 bifosfato, proveniente del metabolismo central de carbono vía glucólisis. Así, aunque el etanol es el principal producto obtenido durante la fermentación, es posible también la obtención, aunque en menor cantidad, de otros productos como tales como glicerol, succinato y acetato, sujetos tanto a las condiciones de la fermentación como a las enzimas específicas involucradas en cada caso.

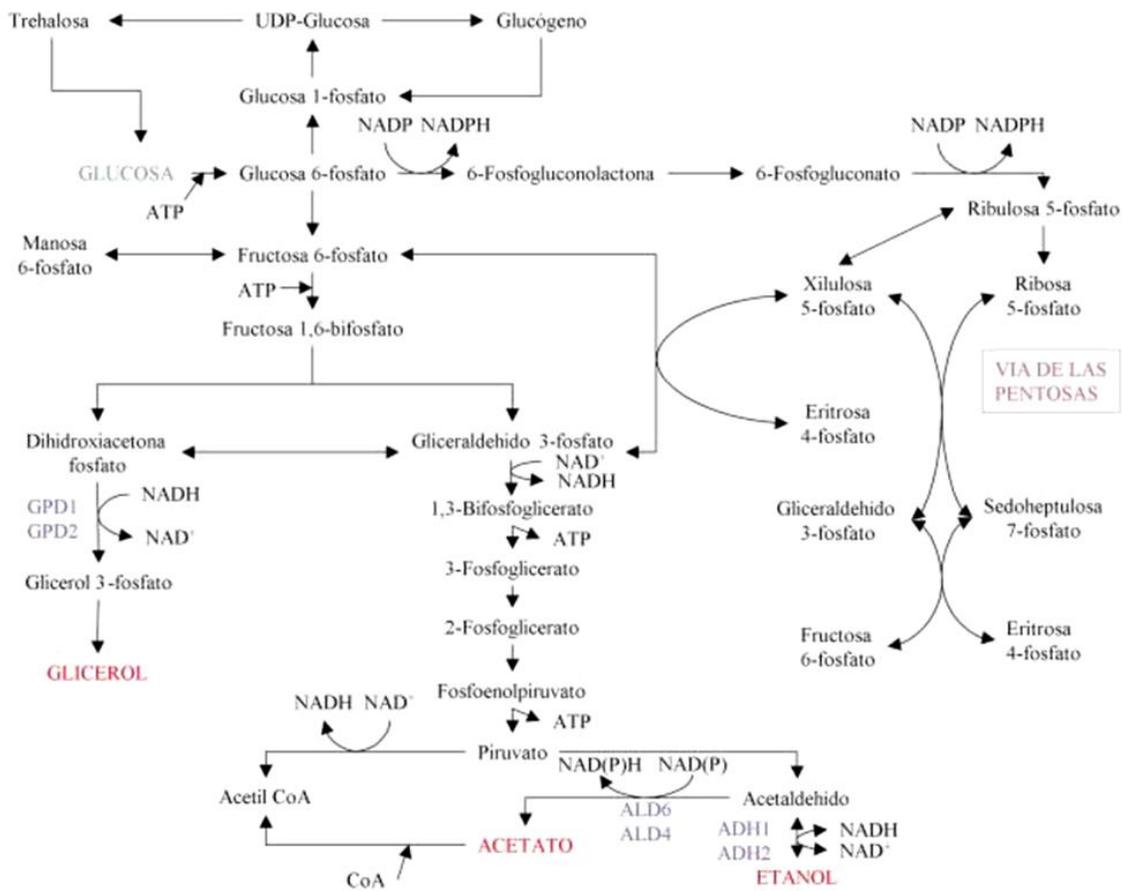


Figura 2. Esquema de las vías metabólicas del catabolismo de la trehalosa, glucosa y glucógeno, mostrando en ella las diferentes etapas que llevan a la producción de etanol, glicerol y acetato (tomado de Biosca *et al.*, 2002).

Se ha observado que el flujo glucolítico es bastante elevado en las levaduras que crecen de manera exponencial en glucosa con velocidades de glucólisis de 200 a 300 μmol de glucosa $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$. Sin embargo el punto de ramificación de piruvato es considerado limitante, ya que puede ser metabolizado por dos enzimas (Biosca *et al.*, 2002): la piruvato deshidrogenasa que convierte el piruvato en CO_2 y acetil CoA , metabolizado posteriormente en el ciclo del ácido cítrico, y por otra parte la piruvato descarboxilasa, que como su nombre lo indica, descarboxila el piruvato generando CO_2 y acetaldehído, el cual posteriormente es reducido por la alcohol deshidrogenasa para dar como resultado la producción de etanol.

De esta manera bajo condiciones de fermentación y niveles altos de piruvato se induce la piruvato descarboxilasa (Biosca *et al.*, 2002).

También ha sido observado que la adición de una fuente de nitrógeno incrementa la eficiencia y velocidad de reacción del tequila, debido a la activación del transportador del azúcar de la levadura (Arrizon y Gschaedler 2002). Es común observar que las reacciones de fermentación utilizan como sustrato glucosa, sin embargo también pueden ser empleados otros azúcares como la xilosa, la lactosa, entre otros, mediante el uso de levaduras en compañía de otros microorganismos. El empleo de sustratos diferentes a la glucosa en la mayoría de los casos es debido a que estos llegan a ser considerados como desecho o se encuentran presentes en la naturaleza en una gran cantidad.

II.2. El estrés por altas concentraciones de etanol

Una de las características típicas de un medio en donde se lleva a cabo la fermentación alcohólica es el estrés que impone el etanol sobre el crecimiento y sobrevivencia de la microflora. En presencia de etanol las células de *S. cerevisiae* y algunas otras especies de levaduras pierden la integridad de la membrana y presentan disminución en la estabilidad del sistema del transporte de solutos, ocurriendo con ello una fuga de compuestos como aminoácidos, nucleótidos, iones metálicos y vitaminas que pueden persistir hasta el final de la fermentación y producir efectos desagradables en el producto. Sin embargo, al iniciar el proceso con un inóculo de 1×10^4 cel mL⁻¹ se aumenta el número de células metabólicamente activas, que pueden producir una mayor concentración de etanol en menos tiempo, y de esta manera se disminuye la concentración de compuestos liberados al medio, evitando así efectos negativos en la calidad del producto (Salgueiro *et al.*, 1988). La adición de ergosterol y ácido oléico bajo condiciones anaeróbicas, y su subsecuente incorporación a los lípidos de la membrana celular, incrementa la tolerancia a las altas concentraciones de etanol en algunas levaduras tales como *S. cerevisiae* y *Hanseniaspora guilliermondii*, mas no en todas la levaduras estudiadas (Pina *et al.*, 2004). Por otra parte, generalmente los medios donde se llevan a cabo la producción de bebidas alcohólicas se caracterizan por tener una alta concentración de azúcares, lo que provoca un estrés osmótico para los microorganismos presentes. Con respecto a lo anterior se ha observado que *S. cerevisiae* se adapta al estrés aumentando la producción de glicerol intracelular como

el principal soluto compatible, para generar un balance en la presión osmótica. Este proceso requiere un incremento equimolar de formación de NADH citoplasmático, donde la formación de acetato juega un papel importante por mantener el balance redox en el organismo (Erasmus *et al.*, 2003). El contar con ciclos fútiles (formación de glicerol, glucógeno y trehalosa, Fig. 2) le permite a la levadura resistir la muerte celular acelerada por sustrato, que es una consecuencia de la incorporación de azúcar y la forforilación subsecuente, ya que estos ciclos crean una demanda temporal de ATP, convirtiéndose en válvulas de escape metabólico. Es autores descartan la especulación acerca de que la formación de ácido acético es debido a contaminantes bacterianos, y se afirma que es debido a la sobreexpresión o decremento de los diferentes genes en *S. cerevisiae* bajo las condiciones de estrés osmótico.

II.3. Sucesión de poblaciones microbianas durante la fermentación alcohólica

El proceso de fermentación alcohólica espontánea como muchos otros procesos no suele ser llevada por un solo tipo de organismo, sino que es producto de la actividad de una diversa cantidad de organismos, lo que implica, que pueden presentarse diferentes tipos de interacciones entre ellos. Es posible que se presente neutralismo, en el caso de que los organismos participantes consuman diferente fuente de sustrato.

Cuando dos organismos necesitan una misma fuente de carbono estos compiten por obtener dicho sustrato, debido a que en el momento en que uno lo consuma se presentará un efecto negativo para el otro microorganismo. En ocasiones este tipo de efectos negativos puede llevar a un punto donde uno de las especies involucradas puede verse afectada presentándose algún tipo de depredación o parasitismo (Zagorc *et al.*, 2001). Sin embargo, esta interacción puede otorgar características que contribuyan en propiedades organolépticas al producto final, como por ejemplo en el vino tinto, en donde se da la interacción entre levaduras y bacterias ácido lácticas, llevándose a cabo primero la fermentación alcohólica y la proliferación de levaduras, y al término de la cual se produce

la fermentación ácido láctica, lo que confiere al vino olores, colores, y un sabor característico. Es por ello de considerar los microorganismos nativos presentes en la periferia de la uva, en los tanques empleados para la fermentación así como los instrumentos que intervienen en la elaboración del vino que pueden contribuir de manera especial en las características y composición química del producto de la fermentación (Fleet, 2003).

Se ha observado que durante el proceso de fermentación se presenta un crecimiento inicial y posterior muerte de levaduras del género *Kloeckera* y *Hanseniospora*, seguido esto por el incremento de la población de *S. cerevisiae*, la cual domina la fermentación alcohólica en la mayoría de los casos, debido al incremento del estrés osmótico que produce el incremento de las concentraciones de etanol (Fleet *et al.*, 1984). Sin embargo algunos organismos a pesar de tener una tolerancia máxima al etanol de 6 % v/v pueden persistir debido a diferentes factores como son la temperatura de fermentación, la viabilidad de nutrientes, el inóculo inicial, los niveles de dióxido de sulfuro así como el número y tipo de organismos presentes (Fleet *et al.*, 2003). Este tipo de interacciones suelen comenzar con interacciones de levadura-levadura, presentándose en los estadios tempranos de fermentación alcohólica en la producción de vinos, por lo menos en los primero dos o tres días de la fermentación, y posteriormente es posible observar un decaimiento de las levaduras no-*Saccharomyces* conforme avanza el tiempo mientras que *Saccharomyces cerevisiae* se mantiene por el resto del proceso fermentativo mostrando con ello el aumento en la concentración de etanol (Pina *et al.*, 2004). Sin embargo este tipo de relación puede modificarse al adicionar un substrato diferente que maneje la fermentación como galactosa o melobiosa, fuentes de carbono que *S. cerevisiae* no puede utilizar pero sí *S. bayanus* (*S. ovarum*) que en este caso puede predominar en la fermentación (Nadal *et al.*, 1996).

El establecimiento de cultivos con poblaciones simultáneas o secuenciales requiere que se presenten diferentes tipos de factores, dentro de los que se pueden mencionar compatibilidad bioquímica y fisiológica de las especies presentes (Navarrete Bolaños *et al.*,

2007), así como la tolerancia para diferentes tipos de estrés como los inducidos por temperatura, luz y radiación, o en algunos casos la tolerancia al uso de inhibidores químicos. Estas interacciones suelen presentarse de una manera tal que pareciese mostrar una ruta definida para estos organismos, como por ejemplo el hecho de que las levaduras *no-Saccharomyces* suelen ser las primeras en incrementar su población durante la fermentación, consumiendo las vitaminas y aminoácidos y con ello limitando en teoría el desarrollo de *Saccharomyces*, sin embargo, al alcanzar estas su límite de tolerancia a la concentración de etanol suelen sufrir una autólisis, liberando nutrientes que sirven como sustrato iniciador para *Saccharomyces* así como también proporcionan manoproteínas, relacionadas con taninos y antocianinas que producen un impacto en la astringencia y el color del vino. En algunos casos se presenta el fenómeno *killer*, que puede dañar a todo un grupo de organismos dicho fenómeno es comúnmente encontrado en organismos como *Candida* spp, *Pichia* spp y *Hanseniaspora* (Fleet, 2003), y en *Saccharomyces cerevisiae*. Por otra parte se debe considerar la posible sucesión de las bacterias acéticas, que en interacción con algunas levaduras y con bacterias lácticas pueden producir alguna alteración en vinos conocidas como enfermedades del vino. Adicionalmente pueden considerarse también la interacción de las levaduras con los mohos (hongos filamentosos), especialmente aquellas especies que pueden desarrollarse sobre la uva y en las vides causando mermas importantes en la cantidad y calidad de la uva (Mesas *et al.*, 1999). Los mohos más comunes en las uvas son especies de los géneros *Botrytis*, *Uncinula*, *Alternaria*, *Plasmopora*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Oidium* y *Cladospodium*, los cuales presentan una alta posibilidad de tener una interacción entre levaduras y hongos, la cual puede producir una serie diferente de metabolitos que suele provocar disturbios ecológicos y retardo en el crecimiento de levaduras, debido a que el crecimiento de hongos puede producir condiciones favorables para el desarrollo de bacterias ácido lácticas, las cuales producen niveles elevados de ácido acético así como otros compuestos que ocasionan el retardo del crecimiento de las levaduras (Fleet, 2003).

Las diferentes interacciones entre microorganismos pueden provocar efectos negativos, como un retraso o paro de la fermentación, pudrición del vino durante su almacenado en la cava o después de su envasado. Sin embargo, también puede producir un efecto positivo el cual consiste en la conducción de la fermentación maloláctica, proceso secundario de la

fermentación donde las bacterias hacen uso de los compuestos malolácticos producidos por la levadura mostrando con ello el refinamiento y una magnífica calidad del vino. Estas relaciones son conducidas por bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus* spp., *Pediococcus* sp. y *Oenococcus* sp) y ácido acéticas (*Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* y *Gluconobacter oxidans*). Sin embargo debido a la vigorosa fermentación este tipo de bacterias suele presentarse en crecimientos bajos a niveles no detectables (Fleet, 1984 y 2003).

II.3.1. Metodologías de estudio de las sucesiones microbianas

Tomando en cuenta los efectos positivos de la presencia de diferentes microorganismos en el sistema de fermentación alcohólica, es importante conocer su identidad y prevalencia para poder inferir su participación en las características bioquímicas y organolépticas finales del producto. Una manera de conocer la identidad de los microorganismos es mediante técnicas clásicas basadas en pruebas bioquímicas y morfológicas. En las últimas décadas se han generado nuevas técnicas basadas en el análisis de ADN microbiano que permiten diferenciar de forma rápida y segura distintas cepas de una misma especie, lo que proporciona la información necesaria para el seguimiento del proceso fermentativo. A continuación se hace una revisión de las metodologías que han sido utilizadas para estudiar las sucesiones microbianas en sistemas de fermentación alcohólica.

II.3.2. Técnicas clásicas para el estudio de sucesiones microbianas

Para el estudio de poblaciones microbianas durante un proceso por técnicas clásicas, existe todo un protocolo para asegurar la correcta caracterización de las poblaciones microbianas presentes, y el cual requiere que la toma de muestra sea conservada a una temperatura de 4 °C para evitar cambios en la composición original de la población, o de preferencia realizar el aislado *in situ*, siendo más fácil su transporte en medio sólido. Una vez que se obtienen colonias individuales, se realiza la purificación y un primer análisis visual de cada uno de los diferentes tipos de colonias presentes registrando, las características de morfología macroscópica, como pigmentación de la colonia, margen y textura de la colonia, forma

celular, entre otras. Cada colonia analizada también es sometida a análisis microscópico para identificar la morfología celular posibilitando con ello la identificación a nivel de género y en algunos casos la especie de organismo. Sin embargo el análisis visual no proporciona una identificación contundente excepto en el caso de colonias típicas, por lo cual se debe hacer uso de pruebas bioquímicas, debiendo registrar resultados positivos o negativos de las distintas pruebas, como formación de gas (CO₂), asimilación de diferentes fuentes de carbono, cambio de coloración del medio por degradación de sustrato. En conjunto las características morfológicas y las pruebas bioquímicas deberán permitir identificar con certeza el género y la especie del organismo. Sin embargo, algunos microorganismos comparten las mismas características físicas y bioquímicas de asimilación de fuente de carbono, por tanto se procede a un análisis de consumo de fuente de nitrógeno. Dentro de los análisis fisiológicos se pueden listar también la síntesis de compuestos amiláceos, temperatura máxima de crecimiento, producción de ureasa, entre otras. Por otro lado en la biotecnología moderna el género y especie no son suficientes para referirse a un organismo, si no que es de importancia conocer la cepa como tal, para lo que son de utilidad algunas técnicas empleadas en la actualidad como las que a continuación se describen.

II.4. Técnicas moleculares para el estudio de sucesiones microbianas

Para la detección e identificación de un microorganismo mediante técnicas moleculares, es necesario en la gran mayoría de los casos extraer ADN ó ARN del microorganismo o de la muestra en cuestión, generalmente seguido por la amplificación de regiones específicas mediante la técnica de PCR, y la detección del producto amplificado, el cual, en casos de identificación, puede ser secuenciado y comparado con secuencias conocidas en el GeneBank.

II.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica permite amplificar regiones específicas del ADN, mediante el uso de iniciadores y una ADN polimerasa termoestable. Siendo estos junto con los desoxinucleótidos trifosfato, los cuales bajo las

propiedades naturales de la ADN polimerasa replican las hebras del ADN empleando para ello ciclos de temperaturas bajas y altas de manera alternada consiguiendo con ello un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, habiendo partido de un mínimo como molde.

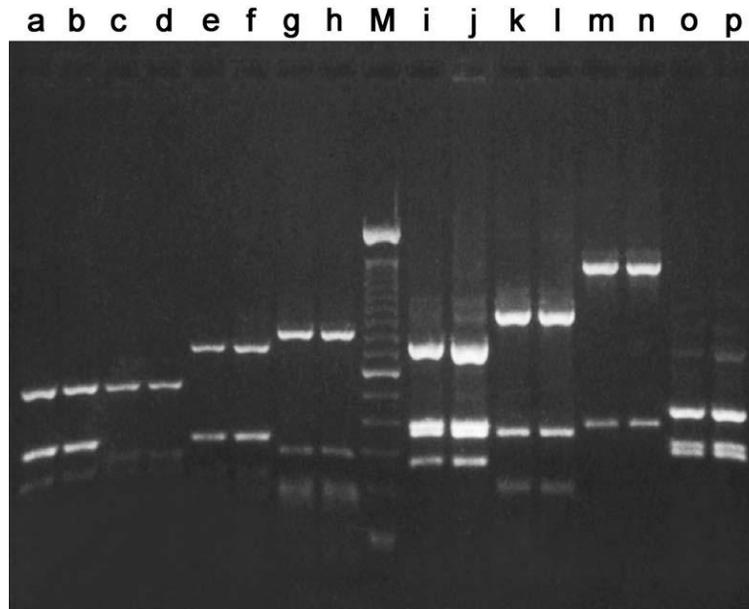


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa donde se muestra la amplificación así como la restricción de algunas levaduras, filas A, B, I y J, *C. stellata*; carriles C, D, K y L, *M. pulcherrima*; carriles e, f, m y n, *K. apiculata*; carriles G, H, O y P, *S. pombe*, M: marcador de peso molecular de ADN, de 100 pb. (Tomada de Capece *et al.* 2003).

La amplificación se observa mediante electroforesis en gel, que consiste en la separación de las diferentes moléculas de ADN en una matriz que habitualmente es agarosa o poliacrilamida, gracias a la movilidad de estas en un campo eléctrico. Las moléculas presentan diferente migración dependiendo de su tamaño.

Un ejemplo de esta técnica en conjunto con una de restricción es mostrado en el trabajo llevado a cabo por Baleiras *et al.* (2005) en el cual el fragmento de 26S rDNA fue amplificado para una posterior fragmentación con enzimas de restricción, y lograr con ello un monitoreo de la diversidad de las especies de levaduras durante la fermentación de vino

tinto. En dicho estudio lograron confirmar la presencia de levaduras *non-S. cerevisiae* durante la fermentación del vino. Otro ejemplo, es la amplificación de la región 18S rRNA, de igual manera para una posterior fragmentación con enzimas de restricción. En dicho estudio fue posible la diferenciación entre especies de levaduras *non-Saccharomyces* apreciado en la figura 3 (Baleiras *et al.*, 2005, Capece *et al.*, 2003).

II.4.2. Electroforesis en campo pulsante (PFGE). En esta técnica el ADN total del microorganismo es sometido a la acción alternante de dos campos eléctricos, pudiendo separarse así fragmentos de hasta 1000 veces mayores que en el caso anterior. Comúnmente suele ser utilizada para visualizar el cariotipo, entre otras aplicaciones más. Tal es el caso mostrado en el trabajo de Sujaya *et al.*, (2004) quienes verifican la diversidad de diversas cepas de *S. cerevisiae*.

II.4.3. Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE). Técnica de huella molecular que consiste en la separación de ADN de doble cadena dependiendo de su temperatura de desnaturalización, permitiendo con ellos discernir diferencias o composiciones discretas entre muestras de complejidad variable.

Ejemplo de la técnica es el presentado por Cocolin *et al.*, (2000) quien caracterizo la diversidad presente en la fermentación del vino.

II.4.4. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). Usada generalmente como marcador para la identificación de grupos particulares puesto que se basa en el polimorfismo del ADN cuando es digerido con enzimas de restricción, lo cual al ser visualizado en gel de electroforesis genera un patrón de bandas polimórficas de diferentes tamaños. Patrón de bandas que difieren entre un organismo y otro por la distancia entre los sitios de corte. Por ejemplo el estudio realizado por Montrocher *et al.*, (1998) quien realiza la caracterización de las levaduras *Saccharomyces* que son utilizadas en la industria de la elaboración de alimentos.

II.4.5. Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP). Esta técnica hace uso de enzimas de restricción para cortar el ADN genómico dejando extremos cohesivos, a los cuales se ligan adaptadores complementarios, para tener extremos romos y de secuencia conocida. Posteriormente dichos fragmentos son amplificados con iniciadores complementarios al adaptador y parte del sitio de restricción. Una vez hecha esta preamplificación, se lleva a cabo una llamada amplificación selectiva, en la que los iniciadores, además de la secuencia conocida, tiene uno o dos nucleótidos de selección, para reducir el número de fragmentos amplificados y de esta manera facilitar su visualización y posterior análisis en un gel desnaturalizante de poliacrilamida, visualizándolos por medio de diferentes técnicas de tinción con marcaje radiactivo o fluorescente.

Este tipo de análisis ha sido empleado para dar seguimiento de sucesiones poblacionales. El uso del AFLP para la caracterización y relación genética entre diferentes géneros y especies de levaduras aisladas del tequila, mezcal, sotol y mosto de agave fue presentado por Flores Berrios *et al.*, (2005), y en dicho estudio los aislamientos analizados pudieron ser divididos en cuatro grupos principales y dos secundarios, logrando con ello mostrar que la técnica tiene poder para mostrar la relación molecular de las cepas u organismos presentes durante la fermentación. Otros estudios que hicieron uso de esta técnica son el de De Barros *et al.* (1999) quienes investigaron la variación genética en cepas comerciales de levaduras, tipos de cepas así como especies aisladas de la industria vinícola; el de Perpete (2001), quien caracterizó e identificó cepas de levaduras cerveceras, describiendo con esto la evolución de las levaduras durante el proceso.

II.4.6. ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD). Estos marcadores son generados por iniciadores de 10 nucleótidos de longitud que amplifican segmentos de ADN genómico de manera aleatoria con una imprimación arbitraria en la secuencia de nucleotídica, permitiendo con ello diferenciar entre organismos genéticamente distintos, analizando los

distintos perfiles electroforéticos generados por los distintos individuos que constituyen su huella característica. Un estudio llevado a cabo bajo esta técnica fue el realizado por Guerra *et al.*, (2001) quien caracterizó las poblaciones de levaduras durante la fermentación de aguardiente.

II.4.7. Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH). En la última década esta técnica ha sido utilizada para la detección directa e identificación de microorganismos mediante microscopía. Dicha técnica hace uso de sondas de ADN marcadas con un fluoróforo el cual suele manifestarse una vez que es llevada a cabo la hibridación de la sonda con la región con homología específica. Mediante ésta técnica fue posible la detección de levaduras no *Saccharomyces cerevisiae* haciendo uso del mapa completo de *Saccharomyces* llevado a cabo para la elaboración de sondas específicas para levaduras no *S. cerevisiae* logrando identificar así diferentes especies de levaduras (Xufre *et al.*, 2006).

II.4.8. Análisis automatizado de los espaciadores intergénicos (ARISA). La técnica ARISA, desarrollada inicialmente para bacterias, consiste en la amplificación de los espacios intergénicos (ITS) entre los genes 16S y 23S, y donde las regiones pueden variar entre 143 y 1529 pb, haciendo uso de la variabilidad natural de las regiones para comparar comunidades microbianas en muestras diferentes. Con esta técnica se pueden crear las huellas genéticas de las comunidades microbianas de una muestra ambiental. Recientemente, Ramette (2009) propone un enfoque cuantitativo haciendo uso de esta técnica (ARISA), tomando en cuenta el tamaño máximo y reproducibilidad del pico así como la abundancia relativa de cada unidad taxonómica operacional (OTU). Dicho estudio fue aplicado a muestras de sedimento marino para examinar cambios específicos en los OTU, demostrando así porque ARISA ha sido utilizado con éxito hasta el momento para describir la dinámica de la comunidad bacteriana sobre los gradientes espaciales y temporales en una variedad de ecosistemas. Sin embargo, el uso de esta técnica en eucariontes se encuentra actualmente en etapa de desarrollo, y no ha sido reportada en sistemas de fermentación alcohólica.

Sin embargo, es común encontrar trabajos en los cuales no sólo hacen uso de una sola técnica de las ya mencionadas, sino que se ha comprobado que el uso y la buena elección de dos o más técnicas pueden proporcionar mayor información de interés, tal es el caso de Lopes *et al.*, (2002), en el cual hacen uso de dos técnicas moleculares RFLP del DNA mitocondrial y la amplificación intercalada del polimorfismo del elemento δ de una sucesión de secuencias para la caracterización de las levaduras nativas presentes en la fermentación espontánea del vino. El uso de ambas técnicas permitió distinguir un mayor número de organismos, proporcionando de esta manera una mejor aproximación de la diversidad presente.

Las técnicas moleculares o de genotipificación permiten dar seguimiento a los microorganismos presentes en los sistemas de fermentación, ya que se ha descrito que es posible inferir teóricamente la presencia mixta a partir de la biomasa total (Ibarra-Junquera *et al.*, 2006), la cual está basada en que todo evento a nivel metabólico o a nivel de interacciones entre especies genera particularidades en la señal de biomasa total. Estos autores demostraron teóricamente cómo cambios en la fuente de sustrato provocan particularidades en la segunda derivada de la señal de biomasa total mientras que crecimientos mixtos inducen particularidades en la primera.

Por otra parte se han visto trabajos referentes a mezcal donde se encontró que es posible monitorear en línea el proceso fermentativo a partir de la medición del potencial redox durante la fermentación (Escalante-Minakata *et al.*, 2008), asociando la señal de redox a la biomasa total. Esta técnica, aunque no permite directamente inferir la identidad de los microorganismos involucrados en la fermentación, resulta útil como indicador de que ha habido un cambio en el tipo de metabolismo (y se podría inferir que por consiguiente de tipo de población dominante) en tiempo real.

En el cuadro 1 se muestran algunas técnicas moleculares que ofrecen una perspectiva para el análisis de los cambios en la estructura de la comunidad microbiana, especialmente cuando se trata de un gran número de muestras. Sin embargo, una seria limitación ha sido la falta de cuantificación que ofrecen las técnicas de este tipo

El estudio de la dinámica poblacional de las fermentaciones alcohólicas busca el entendimiento y eventualmente la manipulación, de manera indirecta, del mecanismo a través del cual una especie de microorganismo impacta a otra y por supuesto las propiedades organolépticas del producto de interés (Fleet *et al.*, 2003). En el caso de las bebidas destiladas mexicanas, el mezcal requiere del análisis de la dinámica poblacional por ser considerado de gran tradición así como artesanal y, sin conocimiento preciso de los eventos microbiológicos que se desarrollan en esta bebida.

Cuadro 1. Técnicas moleculares utilizadas para el análisis de poblaciones microbianas en fermentaciones alcohólicas

Técnica	Proceso fermentativo	Microorganismos	Observaciones relevantes	Autores
	Vino e instalaciones vinícolas	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Dekkera bruxellensis</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>P. membranifaciens</i>	Investigación de la variación genética en cepas comerciales de levaduras, tipos de cepas así como especies aisladas de la industria vinícola. No todas las no- <i>Saccharomyces</i> pudieron ser separadas unas de otras, para las de la misma especie el número de polimorfismo oscilo entre uno y treinta para un solo par de oligonucleótidos.	De Barros <i>et al.</i> , (1999)
AFLP	Mostos del agave (tequila, mezcal), sotol, raicilla.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>S. bayanus</i> , <i>S. paradoxus</i> , <i>S. pastorianus</i> .	Caracterizaron la relación genética entre diferentes géneros y especies de levaduras encontrando una relación directa entre el perfil genético, el origen y el proceso de fermentación en las cepas aisladas del agave.	Flores Berrios <i>et al.</i> , (2005)
	Medio complejo (YPS).	<i>Saccharomyces paradoxus</i> , <i>S. cerevisiae</i> .	Caracterización e identificación de cepas de levadura cervecera. Permitiendo la correcta separación de cada una de las tres cepas de levaduras de cerveza, proporcionando un monitoreo de la evolución de la levadura durante el proceso.	Perpete (2001)
	Vino	<i>Kloeckera</i> , <i>Metschnikowia</i> , <i>Candida</i> , <i>Hanseniospora</i> , <i>Saccharomyces</i> , no- <i>Saccharomyces</i> (<i>Kloeckera</i> , <i>Metschnikowia</i> , <i>Candida</i> , <i>Hansenula</i>).	Caracterización de la diversidad presente en la fermentación del vino, a poblaciones tan bajas como 10 ³ células mL ⁻¹ .	Cocolin <i>et al.</i> , (2000)
DGGE	Comunidades en el tracto gastrointestinal de especies animales con tratamiento de alimentos fermentados.	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Uso de la técnica para el análisis de la comunidad microbiana encontradas en el tracto intestinal, identificando con ello la especie de bacteria predominante.	Simpson <i>et al.</i> , (2002)
	Mezcal	<i>Pediococcus parvulus</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>L. composti</i> , <i>L. parabuchneri</i> , <i>L. plantarum</i>	Uso de la técnica para la caracterización de la comunidad de bacterias ácido lácticas presentes en la fermentación del mezcal.	Narváez Zapata <i>et al.</i> , (2010)
FISH	Vino blanco y tinto.	<i>Candida stellata</i> , <i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>H. guilliermondii</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>K. thermotolerans</i> , <i>Torulaspora delbrueckii</i> , <i>Pichia anómala</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	Detección de levaduras no- <i>S. cerevisiae</i> haciendo uso del mapa completo de <i>Saccharomyces</i> para la generación de sondas fluorescentes específicas para la región D1/D2 del 26S rRNA, logrando la detección de diferentes especies presentes a lo largo de la fermentación.	Xufre <i>et al.</i> , (2006)

Continuación Cuadro 1. Técnicas moleculares utilizadas para el análisis de poblaciones microbianas en fermentaciones alcohólicas

Técnica	Proceso fermentativo	Microorganismos	Observaciones relevantes	Autores
PFGE	Brem, mosto fermentado de arroz Balines (sake).	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Pichia anómala</i> , <i>Issatchenkia orientalis</i> .	Verificaron la diversidad de las diferentes cepas de <i>S. cerevisiae</i> en base a sus polimorfismos cromosomales. Observaron que en algunos aislados la región ITS no pudo ser secuenciada debido a una heterocopia del ITS en el rDNA.	Sujaya <i>et al.</i> , (2004)
RAPD	Cachaça (aguardiente).	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Caracterización genética de las poblaciones de levaduras, así como el polimorfismo genético de <i>S. cerevisiae</i> de aislamientos que se colectaron durante ciclos de fermentación cortos.	Guerra <i>et al.</i> , (2001)
RFLP	Vino	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>S. bayanus</i> , <i>S. pastorianus</i> , <i>S. paradoxus</i>	Uso de la técnica para la correcta caracterización de cepas de levaduras <i>Saccharomyces</i> las cuales son utilizadas en la elaboración de alimentos.	Montrocher <i>et al.</i> , (1998)
	Mezcal (Agave salmiana)	<i>Clavispora luistaniae</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , bacterias <i>Zymomonas mobilis</i> , <i>Weissella paramesenteroides</i> , <i>Lactobacillus pontis</i> , <i>L. kefri</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. farraginis</i> .	Identificación de levaduras y bacterias presentes durante la fermentación, donde se observa que la diversidad presente en el mezcal es dominada por bacterias, como <i>Zymomonas mobilis</i> , <i>Pichia fermentans</i> y <i>K. marxianus</i> .	Escalante-Minikata <i>et al</i> (2008)
PCR-RFLP	Vino	<i>Candida</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Pichia</i> , <i>Schizosaccharomyces</i> , <i>Kluyveromyces</i> , <i>Hansenula</i> .	Amplificación de un fragmento del 18S rRNA DNA, para una posterior restricción, con lo cual lograron diferenciar entre especies de levaduras no- <i>Saccharomyces</i> . Los resultados negativos de <i>S. pombe</i> fue debida a que los oligonucleótidos usados no fueron específicos.	Capece <i>et al.</i> , (2003)
	Vino portugués de uva de variedad Castelao. Uvas de Portugal de variedad Castelao.	<i>S. cerevisiae</i> , <i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>H. vinae</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i> , <i>Candida stellata</i> , <i>Zygoascus hellenicus</i> , <i>Pichia kluyveri</i> , <i>Saccharomycodes ludwigii</i> , <i>Zygosaccharomyces bailii</i> , <i>Issatchenkia</i> , <i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	Amplificación de un fragmento del 26S rDNA para una posterior restricción, consiguiendo un seguimiento de la dinámica poblacional de levaduras durante la fermentación de vino tinto.	Baleiras <i>et al.</i> , (2005)

II.5. El mezcal

El mezcal es una bebida alcohólica obtenida por la destilación y rectificación de mostos preparados con azúcares extraídos del tallo y base de las pencas (hojas) del agave, estas suelen ser cosechadas cuando la planta llega a su madurez alrededor de los 6 a 8 años, y se deja solo el corazón, conocido como la piña. Las piñas posteriormente son cocidas y prensadas obteniendo así el jugo o mosto, que es fermentado por levaduras, generalmente de forma espontánea, en contenedores o tanques especialmente acondicionados. Para la elaboración del mezcal se puede hacer uso de una variedad de agaves por ejemplo: *Agave angustifolia*, *A. americana*, *A. duranguensis*, *A. potatorum*, *Esperrima jacobi* y Amarilidaceas, entre otros. Posterior a la fermentación es necesaria la destilación así como una rectificación (segunda destilación).

El mezcal es un líquido transparente con cualidades organolépticas particulares de olor y sabor específicos de acuerdo a cada tipo de agave usado y el proceso con el que es elaborado; es incoloro o ligeramente amarillo si esta añejado ó reposado, considerando la maduración o la transformación lenta que tiene lugar durante su permanencia en barricas de roble blanco o encino.

II.5.1. Proceso de elaboración del mezcal

Las etapas más importantes para la elaboración de este producto alcohólico son el jimado, cocción o cocimiento de la piña, molienda ó prensado, fermentación y su posterior destilación. A continuación se hace una breve descripción de cada una de ellas.

Jimado. En esta parte inicial del proceso las pencas del agave son cortadas, este proceso suele ser llamado “el castrado”, lo cual suele ser como un tipo de rasurado para eliminar totalmente todas aquellas partes de la planta como pencas y raíces (Fig. 4) que puedan otorgar alguna característica organoléptica desagradable al producto. Enseguida son cortados en cuatro partes llamando a esto descuartizado, trabajo realizado para permitir con mayor facilidad el paso siguiente.



Figura 4. Proceso de jimado. (Fotografía e información tomada de la revista Fundación Produce Oaxaca, 2007)

Cocción. En este punto del proceso la piña trozada es acomodada en el palenque, el cual consisten en un pozo cónico de un diámetro aproximado de 2.5-3.5 metros cavado en la tierra (Fig. 5). Estos suelen ser alineados con piedras calientes, con hojas de agave, petate y tierra, permitiendo así la cocción de la piña por un lapso de aproximadamente 2 a 3 días. Es en este proceso donde el producto puede absorber sabores que serán importantes para las características organolépticas especiales del producto. En este proceso se presenta la hidrólisis de la inulina, principal polisacárido presente en la piña del agave.



Figura 5. Cocción tradicional de las piñas de *Agave* spp en hornos de piedra en el suelo, Municipio de San Carlos (Tamaulipas).

La conversión de la inulina produce una gama de azúcares libres, siendo vista principalmente fructosa, la cual es importante para la fermentación. Sin embargo en este proceso suelen presentarse no solo la hidrólisis de azúcares, sino que estos mismos pueden interaccionar con las proteínas dando consigo un conjunto de reacciones químicas las cuales son conocidas como reacción de Maillard. Este tipo de reacciones, así como las características de sabor y olor de la madera que se producen en el pozo al final suelen otorgar propiedades organolépticas que añaden cuerpo al mezcal.

Molienda. Las piñas una vez cocidas se colocan en molinos característicos conformados por una gran rueda de piedra sujeta a un poste mediante una viga llamado trapiche (Fig. 6), lo que permite el desplazamiento en círculos de esta rueda, movimiento con el que se produce la molienda. Esta puede llevarse a cabo también de manera manual, con la ayuda de troncos huecos y el machete para el desmenuzamiento del maguey, así como su macerado por rodillos rústicos de madera. Cabe mencionar que debido a los avances tecnológicos se presenta también el uso de máquinas destrozadoras de maguey. Todo este proceso es capaz de permitir la mayor cantidad posible de mosto para una adecuada fermentación de los azúcares presentes en el maguey.



Figura 6. Proceso de molienda de las piñas cocidas en un trapiche tradicional de madera, con tracción animal (Municipio de San Nicolás, Tamaulipas).

Fermentación. Este proceso implica el desdoblamiento de hidratos de carbono mediado por el uso de microorganismos que pueden presentarse en los materiales usados o aquellos originalmente presentes en la piña. Esta degradación de azúcares traerá consigo la producción de etanol por medio de fermentación alcohólica, conducida bajo las rutas metabólicas de las levaduras. Se destacan dos tipos de fermentaciones principales: la natural y la inducida o acelerada, siendo la primera aquella que es llevada a cabo por los organismos que están presentes de manera natural en la piña, mientras que la inducida es a la cual le son agregados fuentes de nitrógeno para acortar el tiempo de fermentación (Arrizon y Gschaedler 2002). En este punto los factores a considerar suelen ser la cepa de levadura, aireación, composición del mosto, temperatura y lo más importante el rendimiento en la producción de etanol.

Destilación. El punto de ebullición del etanol es de 78.5 °C lo que permite la primera separación de este metabolito. Para esta destilación es comúnmente usado el alambique, conformado por cuatro elementos de cobre, metal caracterizado por su alta conductividad térmica, que proporciona los márgenes de temperaturas para la adecuada separación. Sin embargo se ha demostrado en este mismo proceso no solamente puede ser destilado el etanol, sino también otros compuestos volátiles como acetaldehído, alcohol amílico, metanol, n-propanol, entre otros (Arrizon *et al.*, 2005). Dicha fase de destilación es llevada a cabo en destiladores artesanales, los cuales son calentados por medio de leña y cuentan

con un serpentín de cobre a través del cual se evapora el mezcal, la condensación de éste se presenta cuando el serpentín se enfría por medio de agua.

Actualmente, la elaboración de esta bebida no solo suele presentarse de manera artesanal, sino que puede producirse de manera tradicional y moderna. En el cuadro 2 se pueden apreciar las variables existentes para la producción de esta bebida.

Cuadro 2. Tecnología empleada en las tres diferentes formas de elaboración del mezcal

Formas de producción / actividad	Producción artesanal	Producción tradicional	Producción moderna
Especie (s) de agave	Varias, sobre todo las silvestres	Una sola, preferentemente el <i>espadín</i> (<i>Agave angustifolia haw</i>)	Uso exclusivo de maguey <i>espadín</i>
Cocimiento	En horno de tierra	En horno de piedra o tierra	En horno de piedra o autoclaves
Molido o triturado	Con mazos de madera o piedra	En molinos con rueda de piedra jalada por bestias de tiro	Con desgarradores mecánicos
Fermentación	En cueros de res, ollas de barro o canoas	En tinas de madera fabricadas ex profeso	En recipientes cilíndricos de acero
Destilación	En ollas de barro con carrizo como tubería	En alambiques de cobre con el uso de leña	En alambiques de cobre o acero de mayor capacidad con uso de leña o gas
Producción	Muy pequeña. Su uso se reserva para las fiestas patronales, normalmente no se comercializa	Para consumo casero y comercial	Eminentemente comercial
Características del mezcal	Inmejorable. Sabor suave y complejo. Olor característico. No produce resaca	De buena calidad. Fuertes variaciones en sus características en función de cada productor	De buena calidad, sin grandes variaciones en sus características, con sabores menos complejos y aromáticos
Productores	Indígenas zapotecos, generalmente alejados de las vías de comunicación principales	Principalmente indígenas zapotecas cercanos a las vías de comunicación y centros urbanos	Indígenas y mestizos que viven cerca de los centros urbanos mas importantes
Nivel de marginación de las comunidades	Alto y muy alto	Medio y alto	Bajo y medio

Tomada de Blomberg Lennart (2001). Tequila, Mezcal y Pulque, Editorial Diana, Mexico, 2001.

II.6. La microbiología del mezcal

Es conocido que los microorganismos no viven aislados en un determinado espacio y tiempo, sino que coexisten con otras poblaciones, dando con ello el establecimiento de relaciones de cada uno de los microorganismos que tienen efectos en la adecuación biológica de las especies que interactúan, logrando como resultado de ello que los distintos consorcios se propaguen dentro de un ecosistema con dinámicas muy diferentes, lo que dependerá de su potencialidad genética, así como de su capacidad de adaptación a las condiciones ambientales (Lappe *et al.*, 2008). Por esto, es importante considerar las posibles interacciones entre los microorganismos aislados de los microsistemas, los cuales comúnmente muestran altos niveles de interacciones no lineales que se presentan en dicho proceso de fermentación durante la producción de la bebida alcohólica. Aunque estas interacciones pueden ir desde el antagonismo a la sinergia entre microorganismos y puede depender, además, de los grupos microbianos y de las especies involucradas, el sustrato tipo y la disponibilidad, se ha encontrado que la fermentación alcohólica del mezcal suele ser llevada a cabo mayormente por *Saccharomyces cerevisiae*, destacando esta como la iniciadora y principal productora durante este proceso, sin embargo cabe mencionar que dicho microorganismo suele ser apoyado por una gran microbiota nativa de levaduras, que confieren esas características organolépticas especiales así como únicas de cada uno de los productos elaborados durante la fermentación (Fleet *et al.*, 1984, 2003). Dicha composición de la microbiota que participa en el proceso de la fermentación dependerá de los siguientes factores: la región de origen de los agaves, procedimiento de producción, concentración inicial de células, temperatura y concentración de etanol presente. Es por tanto que una parte de las propiedades organolépticas son también el resultado de la frecuencia de aparición de los organismos, así como por esos factores limitantes o factores regionales de origen de cada uno de los agaves empleados para la elaboración del mezcal. Por lo tanto, el proceso fermentativo es y debe ser considerado de gran interés, por ser crucial para la industria del mezcal, y de igual importancia resulta ser conocer en lo posible la diversidad de la microflora involucrada y sus interacciones existentes entre la gran gama de organismos que trabajan en conjunto y que producen las características de esta bebida como el cuerpo, sabor y olor.

En el caso de las bacterias presente en los mostos de mezcal, microflora aún menos estudiada que la de levaduras, se tiene el trabajo de Hernández Mota (2010) quien realizó un estudio metagenómico de la flora bacteriana así como el análisis de la acumulación de metabolitos durante la fermentación del mosto del mezcal elaborado en Tamaulipas, encontrando que existe un perfil fermentativo típico de la fermentación alcohólica en la primera fase de esta etapa. El perfil microbiano metagenómico, estudiado por DGGE, mostró que la población microbiana de la fase final de fermentación es muy diferente del resto de las otras etapas de la fermentación, logrando identificar con una correspondencia del 90% a bacterias ácido lácticas de las especies *Lactobacillus parakefiri*, *L. brevis*, *L. similis*, *L. buchneri*, *L. sakei* y *L. plantarum*. Además se lograron identificar otros grupos bacterianos tales como *Methylobacterium organophilum*, *Methylobacterium extorquens*, y *Enterococcus sp* y otras bacterias no cultivables, demostrando con ello además de la presencia de organismos no conocidos, que la diversidad de la gama también difiere dependiendo de cada mosto empleado para la fermentación. Otro estudio en relación a las bacterias presentes durante la fermentación del mezcal es el trabajo de Narváez Zapata *et al.*, (2010) en el cual se realizó una caracterización de la comunidad de bacterias ácido lácticas así como el análisis de la acumulación de metabolitos durante el proceso fermentativo. El perfil estudiado por DGGE logró identificar *Pediococcus parvulus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus composti*, *Lactobacillus parabuchneri* y *Lactobacillus plantarum*. Demostrando con ello que no solo las levaduras están implicadas en las características organolépticas de esta bebida tradicional mexicana.

En el caso de la micoflora, debe recordarse que la actividad que llevan a cabo las levaduras no se limita a la producción de etanol, sino que también participan en los rasgos característicos organolépticos de cada producto, de ahí el interés por estudiar los organismos presentes durante la fermentación que se lleva a cabo en el mezcal. Un ejemplo de este interés es el de Jacques *et al.* (2006) quienes compararon las especies presentes en mostos de mezcal por los métodos moleculares y bioquímicos clásicos, encontrando las especies *S. cerevisiae*, *Candida globata*, *Pichia mexicana*, *P. membranifaciens*, *Issatchenkia orientalis*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Ustilago*

alcommii, *Galactomyces geotrichum* y *Clavispora lusitaniae*. En un estudio más reciente, Arratia Mireles (2010) también en mezcal tamaulipeco, caracterizó molecularmente un total de 48 aislamientos pertenecientes a 9 diferentes especies, y se comparó su producción de etanol. Dichos aislamientos se analizaron por rep-PCR y por un análisis filogenético de la región 26S, obteniendo patrones de bandeo que permitieron diferenciar de manera rápida entre levaduras de diferentes especies. Dentro de las especies de levaduras identificadas se pueden mencionar *Saccharomyces cerevisiae*, *K. marxianus*, *Torulaspota delbrueckii*, *Pichia kluyveri*, *C. lusitaniae*, *Pichia guillermondi*, *P. mexicana*, *Candida parapsilopsis* y *Zygosaccharomyces bailii*, y se encontró que todas eran capaces de producir etanol en concentraciones significativas. En el cuadro 3 se muestran los valores máximos de producción de etanol de los diferentes organismos analizados en el estudio de Arratia-Mireles (2010).

Cuadro 3. Producción máxima de etanol en el medio de mosto a las 60 horas de las especies: *Saccharomyces cerevisiae* (S.c), *Kluyveromyces marxianus* (K.m), y *Torulaspota delbrueckii* (T.d) del cepario de levaduras del mezcal LBI.

Especie	Aislamiento	Producción de etanol (g/L)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sc 4Y3	43
<i>S cerevisiae</i>	Sc 3Y3	49
<i>S cerevisiae</i>	Sc 3Y5	59
<i>S cerevisiae</i>	Sc mosca 3	90
<i>S cerevisiae</i>	Sc 3Y8	27
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Km 4D2	49
<i>K. marxianus</i>	Km mosca 5	5
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Td 1AN5	4.6
<i>T. delbrueckii</i>	Td 1D2	60

Datos tomados de Arratia Mireles (2010).

Todo lo anterior ha permitido incrementar el conocimiento acerca de la microflora presente durante el proceso de elaboración del mezcal tamaulipeco, cuya producción empieza a tener impacto en la economía de la región. En este sentido, es necesario continuar los esfuerzos

dirigidos al conocimiento de las diferentes poblaciones de microorganismos involucrados, así como la comprensión de la importancia de cada uno durante el proceso, y ampliar el conocimiento básico de la fermentación.

III. JUSTIFICACIÓN

El mezcal es una bebida artesanal mexicana que se produce en varios estados de la República Mexicana y su producción es una actividad que ha crecido en los últimos años, demostrando a esta como una alternativa para cubrir necesidades de gran importancia como económicas y sociales (Morales Carrillo *et al*, 2007). No obstante, existen pocos estudios enfocados en la comprensión de las características y cualidades que forman y dan vida al mezcal, específicamente acerca de la amplia variedad de microorganismos involucrados en la fermentación de este producto, y los reportes están mayormente enfocados al estudio del vino, como los elaborados por Montrocher *et al.* (1998), Cocolin *et al.* (2000), Baleiras *et al.*, (2005) y Xufre *et al.*, (2006) entre otros. En cuanto a productos de agave, en específico el tequila, se tiene el reporte de Flores-Berrios *et al.*, (2005), y muy poco con respecto al mezcal, excepto por lo reportado por Jacques *et al.* (2006), Escalante-Minikata *et al* (2008), Lappe-Oliveras *et al* (2008) y Narvaez Zapata *et al.*, (2010), sin embargo, no se conoce en detalle el tiempo específico y la concentración en la que los microorganismos participan en la fermentación de los mostos de agave.

Debido a la importancia del sector mezcalero para el estado de Tamaulipas, se requiere un estudio detallado de las poblaciones microbianas específicas que participan durante el proceso de elaboración del mezcal, por lo cual en este proyecto se propone analizar la presencia temporal y carga específica de las principales levaduras, durante la fermentación del mezcal tamaulipeco, debido a que es la etapa más importante para el desarrollo de las características organolépticas de esta bebida.

IV. HIPÓTESIS

El mosto de mezcal presenta una variación de carga temporal en sus poblaciones de levaduras durante el proceso de fermentación la cual puede ser cuantificada mediante técnicas moleculares.

V. OBJETIVOS

V.1. Objetivo general

Describir la dinámica de poblaciones de tres especies de levaduras durante la fermentación espontánea del mosto de mezcal.

V.1.1. Objetivos particulares

1. Estandarizar las técnicas moleculares (ARISA y FISH) para el monitoreo de las poblaciones de levaduras
2. Mostrar la dinámica de las poblaciones de levaduras utilizando tres especies predominantes durante la fermentación en medio sintético.
3. Mostrar la dinámica de las poblaciones de levaduras utilizando tres especies predominantes durante la fermentación en un medio de mosto.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1. Microorganismos

Las levaduras que se utilizaron en este estudio pertenecen a la colección de levaduras del mezcál del Laboratorio de Biotecnología Industrial, las cuales se encuentran en conservación a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en medio adicionado con glicerol a un 20% de concentración final. La activación de las levaduras se llevó a cabo mediante resiembra en cajas de petri con medio YEPD con agar, el cual fue incubado por 24 horas a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

VI.2. Extracción de ADN

Los microorganismos elegidos para el estudio fueron crecidos en medio YPDA (Extracto de levadura 5 g L^{-1} ; peptona 3 g L^{-1} ; glucosa 20 g L^{-1} ; agar 20 g L^{-1}) en agitación a 250 rpm durante 18 h a una temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se utilizó el protocolo de extracción de ADN propuesto por Raeder y Broda (1985) con algunas modificaciones: utilizando de 40 a 50 mg del material celular, el cual fue sometido a congelación en nitrógeno líquido por 20 s, para su posterior macerado con un pistilo estéril durante 5 s. Se agregaron inmediatamente 500 μL de solución amortiguadora de extracción a temperatura ambiente (200 mM Tris HCl, pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS) y fue incubado 10 min. En seguida se añadieron 500 μl de fenol-cloroformo (50/50) a 4° C para ser mezclados por 5 min y se realizó una posterior centrifugación a 13000 rpm por 30 min. La fase acuosa se colocó en tubo nuevo, y se adicionaron 400 μl de cloroformo frío (-20° C), se mezcló por 1 min para una posterior centrifugación a 13000 rpm por 5 min. Dicho sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo al cual se adicionaron 4 μL de RNAsa (10 mg mL^{-1}) y se incubó por 30 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se adicionaron 500 μL de isopropanol frío a 4° C y se mezcla por inversión para incubar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min para una posterior centrifugación por 5 min. El sobrenadante se desechó y se añadieron 500 μl de etanol al 70% a -20° C para una mezcla por inversión y una centrifugación a 13000 rpm por 5 min. El sobrenadante se desechó para dejar secar la

pastilla por 30 min para posteriormente ser re suspendida en 50 μL de TE 1X o agua miliQ estéril a temperatura ambiente y se mantuvo a 4 $^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

La cantidad de ADN obtenida fue cuantificada por el registro de longitudes de onda a 260 nm y 280 nm en un espectrómetro GBC. La lectura inicial de 260 nm se utilizó para tener la concentración de ácidos nucleicos en la muestra. En dicho caso una densidad óptica (DO) de 1 corresponde a un aproximado de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de doble hebra de ADN, 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en el caso de hebra simple de ADN o ARN. La calidad del ADN se cuantifico mediante el valor de la relación $\text{Abs}_{260 \text{ nm}}/\text{Abs}_{280 \text{ nm}}$, Donde un valor entre 1.8 y 2 indica que se tiene una buena calidad de ADN.

El proceso de cuantificación fue llevado a cabo de la manera siguiente: se diluyeron 10 μL de muestra en un tubo con 1.5 mL de agua estéril para proceder a realizar la toma de lecturas bajo las longitudes de onda anteriormente mencionadas.

VI.3. Extracción de ADN de cultivos mixtos (ADN metagenómico)

Se extrajo el ADN de los cultivos con inóculo mixto de los medios de cultivo (sintético y de mosto) tratándolo como una muestra metagenómica, haciendo uso del método propuesto por Rojas-Herrera (2008). Dicho método fue desarrollado inicialmente a partir de dióxido de silicio, este mismo está basado en que el ADN es capaz de unirse a dicho compuesto bajo altas concentraciones de sales caotrópicas como el ioduro de sodio. Para la extracción del ADN se tomó una pastilla, previamente elaborada de la fermentación que fue llevada a cabo, y se le agregó 1 μL de lisozima dejando incubar por 5 min a temperatura ambiente. En seguida se agregaron 100 μL de SDS al 20%, y se agitó vigorosamente por un minuto para dejarlo en incubación a temperatura ambiente por 30 min (agitación cada 5 min). Pasado este tiempo se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min y el siguiente paso fue transferir el sobrenadante a un nuevo tubo, se agregaron 500 μL de acetato de potasio 5M, se incubó a 65 $^{\circ}\text{C}$ por 5 min; finalmente se colocó el producto en hielo por 20 min. Posteriormente se realizó una centrifugación a 14, 000 rpm por 30 min a 4 $^{\circ}\text{C}$ y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo, se agregaron 200 μL de la suspensión de sílica (2 g de SiO_2 en 50 mL de

agua) y se mezcló suavemente por 3 min. Nuevamente se centrifugó a 16,000 rpm por dos minutos y se descartó el sobrenadante. El siguiente paso fue el lavado de la pastilla de ADN que se realizó con alcohol a 70 % dos veces; se resuspendió en precipitación en 30 µL de agua y se dejó incubar a 55 °C por 5 min. Finalmente se centrifugó a 14000 rpm por dos minutos y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo, y se guardó a -20 °C hasta su uso posterior.

VI.3.1. Amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 por PCR

La reacción en cadena de la polimerasa fue utilizada para dar identificación a nivel especie para confirmar que concuerde con las levaduras empleadas en este estudio.

La amplificación de las regiones ITS fue llevada a cabo utilizando un termociclador GeneAmp PCR system 9700 (marca Perkin Elmer, EEUU) y haciendo uso de los iniciadores reportados por White *et al.* (1990) ITS1 (5´ TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3´) y ITS4 (5´ TCCTCCGCTTATTGATATGC 3´) con las condiciones siguientes: 1X (94 °C 5 min), 35X (94 °C, 30 seg; 59 °C, 30 seg; 72 °C 1 min), 1X (72 °C, 7 min) bajo el contenido descrito en el cuadro 4. Dichos productos de PCR se sometieron a una purificación con el estuche comercial Wizard SV and PCR clean up System.

Cuadro 4. Mezcla de reacción utilizada para la amplificación de la región ITS.

Componente	Volumen (µL)
Buffer (10X)	2.5
MgCl ₂ (25mM)	0.75
Fw (5µM)	1
Rw (5µM)	1
dNTP's (10mM)	0.2
Taq (5U/5µl)	0.2
H ₂ O	18.35
DNA	1
Volumen total	25

VI.3.2. Amplificación de la región 26S por PCR

La amplificación de la región 26S fue llevada a cabo utilizando un termociclador marca *GeneAmp PCR system 9700* (Perkin Elmer, EEUU) y haciendo uso de los iniciadores reportados por White *et al.*, (1990) NL1 (5' GCATTCAATAAGCGGAGGAAAAG 3') y NL4 (5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG 3') con las condiciones: 1X (94 °C, 5 min), 35X (94 °C, 30 s; 61 °C, 30 s; 72 °C 1 min), 1X (72 °C, 7 min) con el contenido descrito en el cuadro 5. Dichos productos de PCR se sometieron a una purificación con el estuche comercial Wizard SV y el PCR clean up System.

Cuadro 5. Mezcla de reacción utilizada para la amplificación de la región 26S.

Componente	Volumen (µL)
Buffer (10X)	2.5
MgCl (25mM)	0.75
Fw (5µM)	1
Rw (5µM)	1
dNTP's (10mM)	0.2
Taq (5U/5µl)	0.2
H ₂ O	18.35
DNA	1
Volumen total	25

VI.3.3. Electroforesis en gel de agarosa

Para la visualización de los productos de PCR el gel de agarosa se preparó al 1% en solución TBE 1X. Se mezclaron 5µL del producto y 2 µL de SyberGold™ para ser depositados en los pocillos del gel, el cual fue corrido en una cámara de electroforesis horizontal de la marca Bio-Rad a 100 V por 40 min. Se utilizó un transiluminador de luz ultravioleta, para la visualización y la imagen del gel fue captada en el programa Kodak digital Science™ 1D. A partir del ADN obtenido se amplificaron las regiones 26S e ITS de las levaduras del estudio, mediante el uso de los pares de oligonucleótidos descritos en la sección anterior.

VI.3.4. Polimorfismo de Conformación de Cadena Sencilla (SSCP)

El protocolo usado para el análisis de la comunidad de levaduras mediante la técnica de SSCP fue estandarizado en el Laboratorio de Biotecnología Industrial, y se utilizaron los siguientes reactivos mostrados en el cuadro 6.

Cuadro 6. Reactivos empleados para la elaboración del gel de acrilamida al 10%

Reactivo	Gel al 10%
40% Acrilamida/Bis	10 mL
10X TBE	4 mL
Glicerol 100%	2.4 mL
TEMED	40 µL
Persulfato de Amonio	400 µL
Agua desionizada	40 mL

Para el montaje de la técnica se prepararon los vidrios, donde se llevo a cabo la electroforesis, estos fueron lavados con detergentes neutros. Posteriormente fueron lavados con agua destilada y se dejaron secar, una vez secos se lavaron de igual manera con etanol al 100% y fueron secados con papel absorbente. Una vez secos los cristales se colocaron los separadores sobre la cara del vidrio de mayor tamaño y encima el vidrio pequeño para crear así el espacio necesario para el gel de acrilamida. Puestos los vidrios y los separadores se sellaron todas las orillas con cinta teflón para evitar el derrame del gel mientras se polimeriza. Una vez que los vidrios fueron alineados en forma inclinada se procedió a verter la solución de acrilamida al 10%, colocándola con ayuda de una jeringa procurando con ello no crear y dejar burbujas dentro de los cristales. Se retiraron los cristales del sujetador de plástico, el teflón y se lavo el exceso de acrilamida con agua destilada.

Posteriormente se colocaron los vidrios dentro de la cámara de electroforesis, se llenó la cámara con medio litro de amortiguador TBE. Cargada la cámara se procedió a realizar una pre-corrida del gel, aplicando azul de bromofenol, durante un lapso de tiempo de aproximadamente 1 hora bajo las condiciones estandarizadas.

Las muestras, antes de ser cargadas, fueron mezcladas con una cantidad de amortiguador de corrida equivalente al volumen del producto de PCR, posteriormente pasaron a una desnaturalización de 95 °C por 5 min y puestos en hielo hasta la aplicación de éstos en el gel. Terminada la electroforesis de aproximadamente 48 horas, el gel es desprendido de los cristales y puesto en un recipiente con 200 ml de amortiguador TBE con 20 µL de Syber Gold para su tinción. Después de un tiempo de 30 min el gel fue retirado para ser visualizado en el fotodocumentador.

VI.3.5. Secuenciación de la región ITS y 26S

Los fragmentos amplificados fueron secuenciados haciendo uso del secuenciador automático de columna ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, EEUU) con el oligonucleótido ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') *forward* para la región ITS y NL1 (5' GCATTCAATAAGCGGAGGAAAAG 3') *forward* para la región 26S. Dichas condiciones que se utilizaron para secuenciar se muestran en el cuadro 7. Bajo las condiciones: 1X (96 °C, 1 min), 25X (96 °C, 10 s; 59 °C para ITS o 61 °C para 26S, 30 s; 60 °C 4 min). Posteriormente la reacción de secuenciación fue purificada adicionando 2 µL de EDTA 125 mM, 2 µL de NaOAC 3M pH 5.2 y 50 µL de etanol absoluto mezclando suavemente e incubando a -20 °C durante 20 min y centrifugando a 14000 rpm por 15 min a 4 °C, se hizo un segundo lavado con 70 µL de etanol al 70% mezclando, incubando y centrifugando como en el paso anterior, secando la pastilla utilizando un termo-mixer (Eppendorf) durante aproximadamente 30 minutos, posteriormente fueron secuenciadas en el Área de Biotecnología del CBG.

Cuadro 7. Reacción para secuenciación

Componentes	Volumen (μL)
Buffer big dye (5X)	4
Iniciador <i>forward</i> ($5\mu\text{M}$)	1
Byg dye	4
Templado	3
H ₂ O	8
Volumen total	20

VI.4. Medios de cultivo

Los aislamientos se activaron en el medio de cultivo rico YPFA (cantidad por litro: extracto de levadura 5 g, peptona 3 g, fructosa 20 g y agar 20 g) aforando hasta un litro con agua destilada, siendo este calentado por aproximadamente 15 min, posteriormente fue sometido a esterilización, y fue vertido en cajas petri de 9 cm de diámetro. Una vez solidificado el medio cada aislamiento fue sembrado por duplicado en cajas petri para asegurar el crecimiento de la cepa en cuestión.

Para preparar el inóculo de los experimentos, se tomó una asada del aislamiento reactivado en YPFA, y se inoculó en 30 mL del medio de precultivo rico en glucosa, el cual tiene la siguiente composición: extracto de levadura 1 g L^{-1} , KH_2PO_4 5 g L^{-1} , $\text{MgSO}_4 (\text{H}_2\text{O})_7$, 0.4 g L^{-1} , glucosa 20 g L^{-1} , y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g L^{-1} , llevando dicha mezcla de reactivos a un volumen final de un litro con agua destilada, se ajustó el pH a 5 con una solución de ácido ortofosfórico, fue calentado durante un tiempo aproximado de 15 min y posteriormente vaciado en matraces de 250 mL para ser esterilizado por 15 min a $121 \text{ }^\circ\text{C}$.

La concentración inicial de inóculo de cada una de las levaduras fue de $1 \times 10^4 \text{ cel mL}^{-1}$ en el caso de concentración a 1, y de $1 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ en el caso de inóculo a 0.1, cuantificado mediante la cámara de Neubauer.

VI.4.1. Medio de cultivo sintético

Los matraces con medio de pre cultivo fueron inoculados con 100 μl de aquellos previamente crecidos en medio líquido YPF y puestos en agitación a 250 rpm durante 18 h a una temperatura de 30 °C. Una vez pasado el tiempo se llevó a cabo una cuantificación celular mediante el uso de la cámara de Neubauer con el fin de determinar el volumen necesario para iniciar la cinética a 1×10^4 cel mL^{-1} . La cinética fue llevada a cabo y evaluada en el medio con la composición indicada en el cuadro 8.

Cuadro 8. Medio de cultivo sintético

Reactivo	Concentración (g L^{-1})
Extracto de levadura	1
KH_2PO_4	5
$\text{MgSO}_4(\text{H}_2\text{O})_7$	0.4
Glucosa	10
Fructosa	90
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2

Las cepas fueron crecidas en tubos falcón de 50 mL con medio YPF con un volumen final de 30 mL a una temperatura de 30 °C y evaluadas en diferentes tiempos (0, 6, 12, 24, 48, 60, 84 y 120 h), para dicha evaluación se llevaron a cabo 2 repeticiones, de igual manera que se hicieron dos tratamientos, el primero con la misma concentración celular inicial (1×10^4 cel mL^{-1}) de los tres microorganismos elegidos por su alta producción de etanol (*S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *T. delbrueckii*) y el segundo con 1×10^3 cel mL^{-1} (*Sc*) y las otras 2 cepas con 1×10^4 cel mL^{-1} (*Km* y *Td*).

VI.4.2. Medio de mosto de agave

Con el fin de estudiar el sistema de fermentación del mezcal bajo condiciones de vinata, se preparó un medio de cultivo basado en mosto fresco de *Agave* spp, el cual fue filtrado y centrifugado a 7000 rpm por 15 min, y debido a que su concentración inicial de azúcares reductores arrojado por los resultados del método de DNS que fue de 170 g L^{-1} , fue diluido con agua estéril hasta alcanzar una concentración de 100 g L^{-1} de azúcar, y se suplementó con 1 g L^{-1} de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, y se esterilizó por autoclaveado para matar a los microorganismos presentes. Los experimentos se llevaron a cabo en tubos falcon de 15 mL y por duplicado, incubándolos a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 120 horas. Se cuantificó la concentración de azúcar residual en cada experimento utilizando cromatografía líquida de alta presión y la biomasa por peso seco.

VI.5. Determinación de la productividad de levaduras por HPLC

Para la cuantificación de la producción de etanol, azúcares, ácidos grasos y glicerol, las muestras tomadas durante las 120 horas del cultivo fueron sometidas a una centrifugación a 13000 rpm y fueron filtradas en una membrana de $0.20 \text{ }\mu\text{m}$. y fueron inyectados $20 \text{ }\mu\text{L}$ de la muestra en un equipo de HPLC (Agilent 1100 seriesTM) equipado con una columna BioRadTM Aminex HPX (300 X 7.8 mL). La fase móvil fue preparada con agua milliQ y ácido sulfúrico al 0.005M la cual contó con un flujo de 0.5 mL min^{-1} con un tiempo de análisis de 30 min, a una temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$ y con una DO de 190 nm. Se elaboró una curva de calibración, de cada uno de los diferentes metabolitos a cuantificar, que fue preparada con concentraciones conocidas, de 0 a 20 g L^{-1} del compuesto a analizar, tomando en cuenta que el coeficiente de correlación de Person (R^2) no deberá ser menor a 0.95.

VI.6. Cuantificación de biomasa por peso seco

Esta técnica permite la estimación de la biomasa total de cada levadura. Para ello se pesaron tubos Falcon de 50 mL limpios y secos, y se les agregó 30 mL del medio YPF e

inoculó con las levaduras a probar, y se corrió la fermentación durante 120 hs, después de lo cual se centrifugó a 2500 rpm por 15 min y se colectó el sobrenadante, y el tubo con la pastilla celular se secó a 40 °C por 24 h, se colocó en un desecador por 12 h más, y se pesó el tubo con la muestra seca, restándole el peso del tubo limpio como se observa en la fórmula. La fórmula utilizada se muestra a continuación:

$$PS = \left(\frac{Pf - P0}{V} \right) - PS \text{ del mosto}$$

Donde:

Pf = peso final de la muestra en el tubo

P0 = peso del tubo

V = Volumen de la muestra

PS = peso seco

VI.7. Diseño de sondas y estandarización de la técnica Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

Debido a que uno de los objetivos del presente trabajo era proponer sondas específicas a las levaduras del mezcal, se trabajó con las secuencias de los aislamientos seleccionados (región 26S) para realizar el diseño de las mismas y compararlas con las reportadas en la literatura. Para ello se obtuvieron secuencias homólogas tanto de las especies de interés como de otras especies disponibles en el banco de datos del NCBI empleando el programa *CLC sequence viewer 5*, así como el programa *Primer Select* del *DNASTAR* (Laser gene) y adicionalmente se llevó a cabo un análisis de manera manual para elaborar la sonda para cada grupo de levaduras y evitar con ello la existencia de zonas conservadas que pudieran causar reacciones cruzadas en las identificaciones.

Determinada la elaboración de cada sonda, la optimización de las condiciones de hibridación se hizo bajo concentraciones de formamida de 35, 30, 25 y 10%. Esto se hizo con el fin de seleccionar aquella concentración que permitiera la hibridación de la sonda en la célula y tuvieran una fluorescencia fuerte y definida, se continuó con la estandarización y uso de las sondas reportadas por Xufre *et al.* (2006) así como para los controles de DAPI, FUNK y EUK, para las 3 especies de levaduras que fueron utilizadas en este trabajo.

VI.7.1 Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

La detección específica de cada especie de levaduras, se llevo a cabo mediante la técnica FISH. Los aislamientos fueron activados de manera aeróbica en medio YM (20 g L⁻¹ de glucosa, 5 g L⁻¹ de extracto de levadura y 3 g L⁻¹ de peptona), bajo condiciones de agitación de 250 rpm a 25 °C. Se hizo un diseño de sondas en base a las secuencias del 26S rRNA de las levaduras del mezcal utilizadas, y se compararon con el desempeño de las sondas reportadas por Xufre *et al.* (2006) y de las cuales fueron usadas las 3 primeras en este trabajo (cuadro 9), incluyendo las sondas universales EUK y FUNK diseñadas de la región 26S rRNA D1/D2, reportadas por Xufre *et al.* (2006).

Cuadro 9. Secuencias de la sondas de la región 26S rRNA D1/D2 especie-especificas de levaduras presentes en la fermentación alcohólica. Reportadas por Xufre *et al.* (2006).

Sonda	Posición	Secuencia	Especie/Reino
Sce	D527	TGACTTACGTCGCAGTCC	<i>S. cerevisiae</i>
Tde	D495	GCAGTATTTCTACAGGAT	<i>T. delbrueckii</i>
Kma	D94	AGCTACAAAGTCGCCTTC	<i>K. marxianus</i>
Cst	D133	CTCTATGGCGTTTCTTTC	<i>C. stellata</i>
Hgu	D506	CAATCCCAGCTAGCAGTAT	<i>H. guillermondii</i>
Huv	D507	TCAATCCCGGCTAACAGTA	<i>H. uvarum</i>
Kth	D196	ATAGGACTAGACTCCTCG	<i>K. thermotolerans</i>
Pan	D499	GACAGGCAATATCAGCAGA	<i>P. anomala</i>
Pme	D167	AGAGCTTCGCACGGCACC	<i>P. membranifaciens</i>
EUK	-----	ACCAGACTTGCCCTCC	Eucariontes
FUNK	-----	CTCTGGCTTCACCCTATTC	Fungi

La preparación de la muestra consistió en que, una vez crecida la levadura se colocó un μl en la laminilla, previamente cubierta con gelatina (0.1%) y 0.01% de $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$, y se dejó secar a temperatura ambiente durante 40 min. Posteriormente se procedió a dar una deshidratación con EtOH a tres diferentes concentraciones (50, 70 y 96%) durante un periodo de 3 min en cada una. Una vez terminada la deshidratación se pusieron a secar a temperatura ambiente durante 20 min. Durante el secado se procedió a preparar una solución de hibridación [(NaCl 0.9M, Na_2EDTA 5mM, Tris/HCl 20mM pH 7, SDS 0.01%)] (70%) y formamida (30%) para evitar la evaporación de la sonda durante la hibridación. De dicha solución se tomaron 9 μl por cada 1 μl de sonda, dichos 10 μl fueron puestos sobre la muestra ya deshidratada y seca para ser metidos en un tubo falcón de 50 mL para ser puestos en hibridación en el horno a 42 °C de 1 a 4 h. Terminada la hibridación se dio un lavado de manera cuidadosa con agua destilada y se sometió a buffer de lavado (NaCl 0.9M, Na_2EDTA 5mM, Tris/HCl 20mM pH 7, SDS 0.01%) durante 15 min. Terminado el lavado con buffer se procedió a dar otro lavado con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente. Seca la laminilla se procedió a poner unas gotas de aceite Citifluor® (Gargille, EEUU) en la laminilla antes de colocarle el cubreobjetos para retrasar la oxidación de la muestra al contacto con la luz UV.

VI.7.2. Microscopia de epifluorescencia

La visualización de la detección dada por la hibridación fluorescente *in situ* de las levaduras empleadas en el estudio fue llevada a cabo utilizando un microscopio marca Olympus BX51 (Japón) con un iluminador del reflector BX-URA2, el iluminador de fluorescencia BX-RFA con filtro de barrido U-RSL6EM (U-RSL6), uso de los filtros U-MWIG2 (excitación máxima 552 nm y emisión máxima 565 nm) para las sondas con marcaje Cy3 y el filtro U-MNUA2 (excitación máxima 372 nm y emisión máxima 456 nm) para DAPI (4',6-diamidino-2-fenil indol dilactato). El microscopio tenía acoplada en el triocular una cámara RGB Infinity conectado a una computadora personal con el programa de análisis y procesamiento de imágenes Image-Pro Plus versión 6.3 (Media Cybernetics, EEUU).

VI.8. Análisis automatizado de los espacios intergénicos del rRNA (ARISA) y su estandarización en muestras de levaduras

Para dar el seguimiento de manera puntual a las especies de levaduras presentes durante las fermentaciones, se procedió a centrifugar el medio, obteniéndose así el concentrado celular, a partir del cual se llevó a cabo la extracción de ADN del cultivo mixto (metagenómico).

Una vez contando con el ADN de las muestras se obtuvieron las amplificaciones de las regiones ITS y 26S para continuar con el protocolo de la técnica. Dichas amplificaciones fueron preparadas y sometidas al equipo ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, EEUU).

El análisis aquí propuesto se realizó de acuerdo a Jones *et al.* (2007), utilizando los dos juegos de oligonucleótidos ITS1-ITS4 marcado con HEX en el extremo 5' y NL1-NL4 marcado con FAM en el extremo 5', y haciendo uso del marcador de peso molecular denominado GenScan™ 1200 LIZ® (Applied Biosystems, EEUU) ajustando las condiciones experimentales como temperatura y tiempo de retención de la muestra para las diferentes especies de bacterias y levaduras de acuerdo a Knief *et al.* (2008).

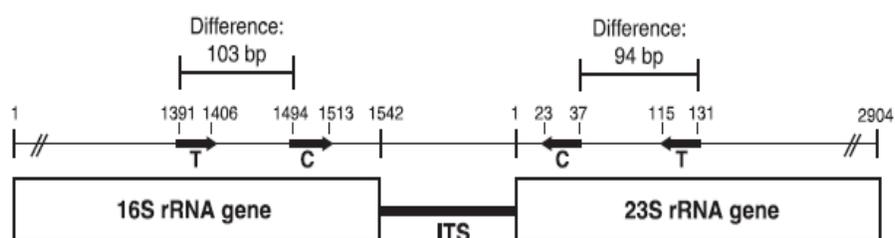


Figura 7. Representación grafica de las regiones amplificadas en el análisis ARISA en bacterias. Imagen tomada de Jones *et al.* (2007).

Una vez amplificada la región ITS (fig. 7) y 26S llevada a cabo utilizando un termociclador GeneAmp PCR system 9700 (Perkin Elmer, EEUU) y haciendo uso de los iniciadores

correspondientes, dichos productos de PCR se sometieron a la mezcla descrita en el cuadro 10 con las condiciones: 1X (94 °C, 3 min) e inmediatamente puesto en hielo.

Cuadro 10. Mezcla de reacción utilizada para ARISA.

Componente	Volumen(μL)
Producto de PCR	1
Formamida	10.5
Marcador (GenScan™ 1200 LIZ®)	0.5

Cabe mencionar que existen muy pocos reportes del uso de la técnica ARISA en eucariontes, sin embargo, el análisis *in silico* de las regiones 26S e ITS en geles de agarosa y lo obtenido con el SCCP sugirieron que era factible realizar el ARISA en muestras de cultivos mixtos de las levaduras empleadas en este estudio en dos medios de cultivo diferentes. En resumen, los tamaños esperados de acuerdo a las secuencias son los que se muestran a continuación en el cuadro 11, y donde es posible apreciar que, aún para aislamientos de la misma especie, hay diferencias de tamaños en sus fragmentos que podrían ser detectados con la técnica de ARISA.

Cuadro 11. Tamaños de las secuencias de la región 26S e ITS para los aislamientos de levaduras

Organismo	Tamaño del fragmento 26S	Tamaño de secuencia ITS
	(pb)	(pb)
Sc 3Y3	586	736
Sc 3Y5	570	711
Sc mosca3	580	
Sc 3Y8	585	879
Km 4D2	553	678
Km mosca5	553	691
Td 1AN5	573	664
Td 1D2	584	674

VI.9. Análisis bioinformático

Se analizó el porcentaje de identidad de la región ITS entre las 3 especies utilizadas durante la fermentación utilizando las aplicaciones del programa BLAST, basados en la comparación de las secuencias depuradas contra la base de datos del Genbank así como contra bases de datos específicas de levaduras almacenadas en el website de NCBI. Se analizaron los resultados obtenidos de la comparación entre secuencias y se procedió al análisis para el diseño de las sondas especie-específicas haciendo uso del programa *CLC Sequence Viewer* así como la aplicación *Primer Select* del programa DNA Star de la compañía Laser Gene. De los diseños realizados se eligieron las sondas que fueran diferentes en su secuencia e impedir con ello la localización de alguna zona conservada entre especies para el uso de estas sondas en este estudio.

VII. RESULTADOS

VII.1. Elección de las levaduras de estudio

Las levaduras utilizadas durante el desarrollo de este trabajo fueron seleccionadas por su mayor rendimiento en la producción de etanol así como mayor consumo de los azúcares presentes (Arratia Mireles, 2010), eligiendo *S. cerevisiae* 3Y5, *K. marxianus* 4D2 y *T. delbrueckii* 1D2 (cuadro 3).

VII.2. Extracción y amplificación de ADN

Una vez seleccionadas y crecidas las especies a analizar durante este estudio se procedió a la extracción de ADN el cual se puede apreciar en la figura 8 que fue de buena calidad para los análisis posteriores, con una pureza cerca del 70% calculada mediante el uso de la cuantificación de la relación de $Abs_{260\text{ nm}}/Abs_{280\text{ nm}}$ por lo que se prosiguió a la realización de los análisis siguientes.

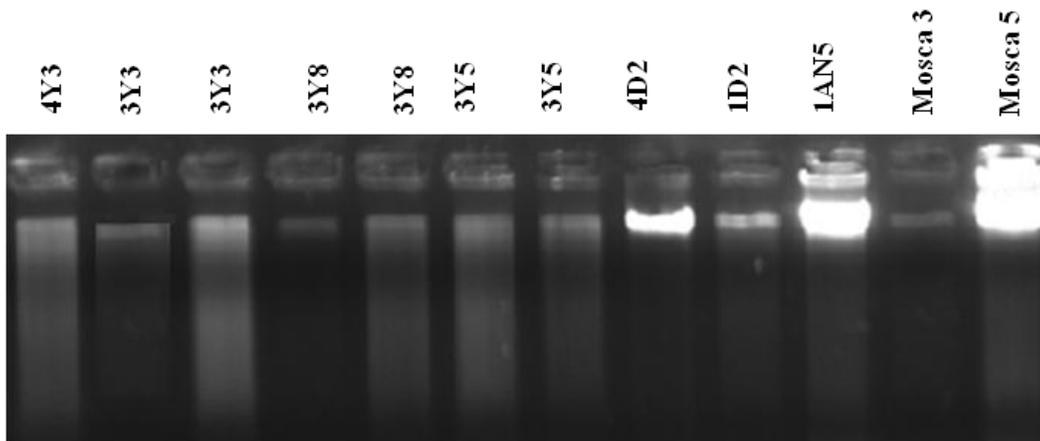


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de la extracción de ADN de las levaduras de estudio.

En la figura 8 se muestra en los carriles del 1 al 7 y el carril 11 el ADN de las levaduras de la especie *S. cerevisiae*, en los carriles 8 y 12 ADN de las levaduras de la especie *K. marxianus* y en los carriles 9 y 10 el ADN de las levaduras de la especie *T. delbrueckii*.

De igual manera que en el caso de las muestras individuales se realizó una extracción de ADN de los cultivos mixtos elaborados en medio sintético y medio de mosto, siendo esta una muestra metagenómica, obteniendo así los resultados que se muestran en las figuras 9 y 10.

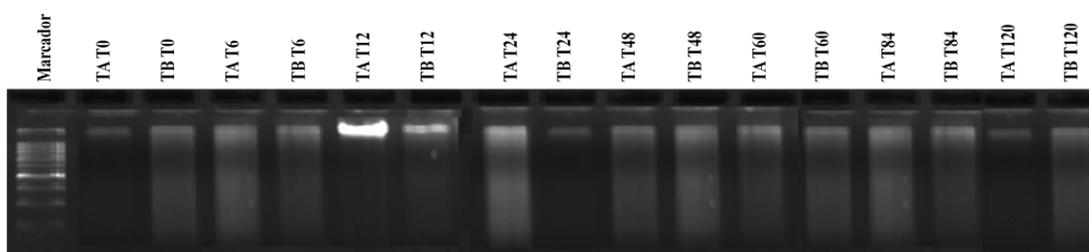


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa de la extracción de ADN del cultivo mixto en medio sintético. TA es el inoculo de 1:1:1, TB el inoculo de 0.1:1:1 de *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *T. delbrueckii* acompañados del tiempo de toma de muestra.

En la figura 9 podemos observar la presencia de ADN extraído de la fermentación llevada a cabo en medio sintético con las tres levaduras principales de la fermentación del mosto de mezcal. Mostrando el marcador de peso molecular, TA inoculo 1:1:1, TB inoculo 0.1:1:1, a las diferentes horas de toma de muestra.

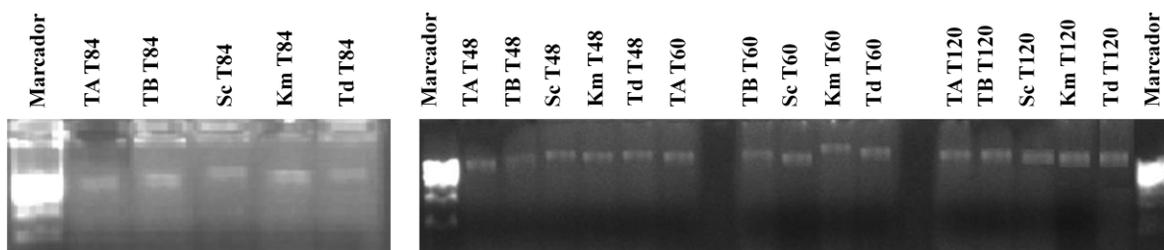


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de la extracción del ADN del cultivo mixto del medio de mosto. Donde TA es el inoculo de 1:1:1, TB el inoculo de 0.1:1:1 de *S. cerevisiae* (*Sc*), *K. marxianus* (*Km*) y *T. delbrueckii* (*Td*) acompañados del tiempo de toma de muestra (antecedido por la letra T).

En la figura 10 se puede apreciar el ADN extraído de cada una de las muestras tomadas durante el transcurso de la fermentación en medio de mosto, observando que no hay ADN de las primeras horas de muestreo puesto que no se pudo obtener mediante la extracción. En la fig. 11 se muestran los fragmentos obtenidos en la amplificación por PCR de la región 26S con un tamaño de alrededor de 550 a 600 pb, así como los fragmentos de la región ITS en los cuales el tamaño oscila entre 700 y 800 pb. Mostrando en el primer carril el marcador de peso molecular, del carril 2 al 6 amplificación de las levaduras de la especie *S. cerevisiae*, carriles 7 y 8 amplificación de las levaduras de la especie *K. marxianus* y los carriles 9 y 10 amplificación de las levaduras de la especie *T. delbrueckii*. Con el ADN obtenido se procedió a realizar una amplificación de las regiones 26S e ITS de las levaduras tanto de manera individual como con las muestras metagenómicas obtenidas del medio sintético y de mosto, dicha amplificación se muestra a continuación en la figura 11, 12 y 13.

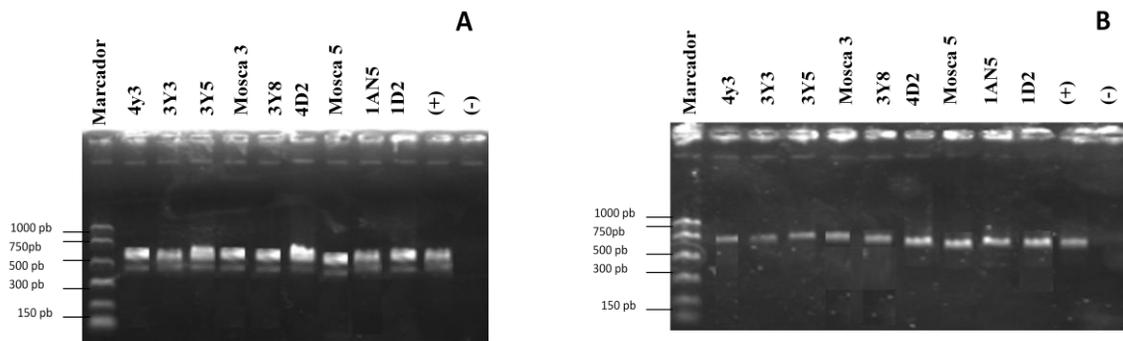


Figura 11. Amplificación de las regiones 26S e ITS de las levaduras de estudio. (A) Iniciadores NL1y NL4 (B) iniciadores ITS1 e ITS4. Marcador de peso molecular, muestras de levaduras, (+) control positivo, (-) control negativo.

En la fig. 13 se aprecia el fragmento de amplificación entre 720 – 880 pb de la región ITS así como el fragmento de amplificación de la región 26S que oscila entre los 580 – 630 pb, de cada una de las muestras tomadas durante el transcurso de la fermentación con medio de mosto.

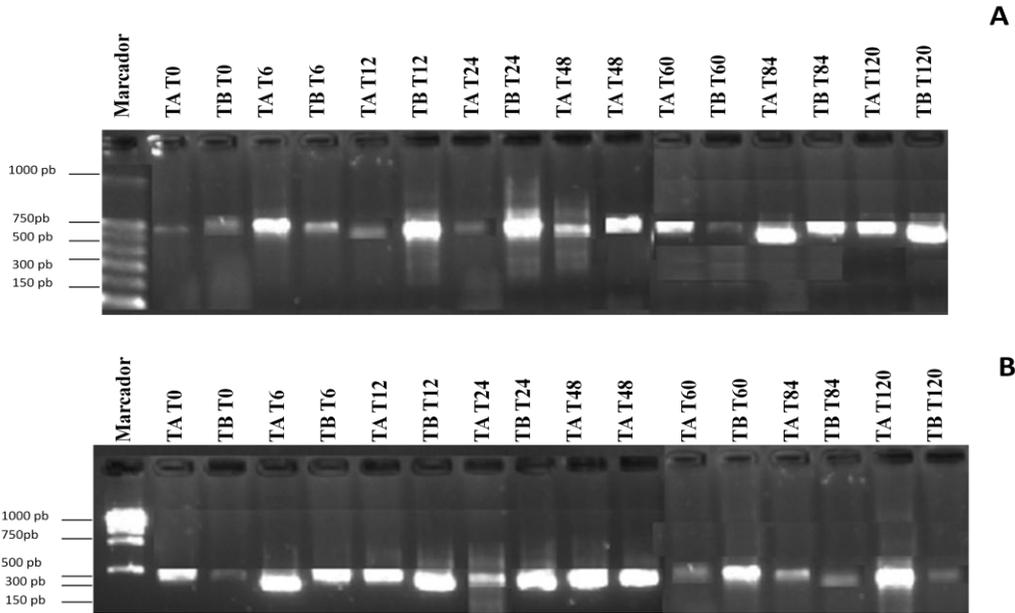


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación de las regiones (A) ITS y (B) 26S de medio sintético. Donde TA es el inoculo de 1:1:1, TB el inoculo de 0.1:1:1 de *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *T. delbrueckii* acompañados del tiempo de toma de muestra.

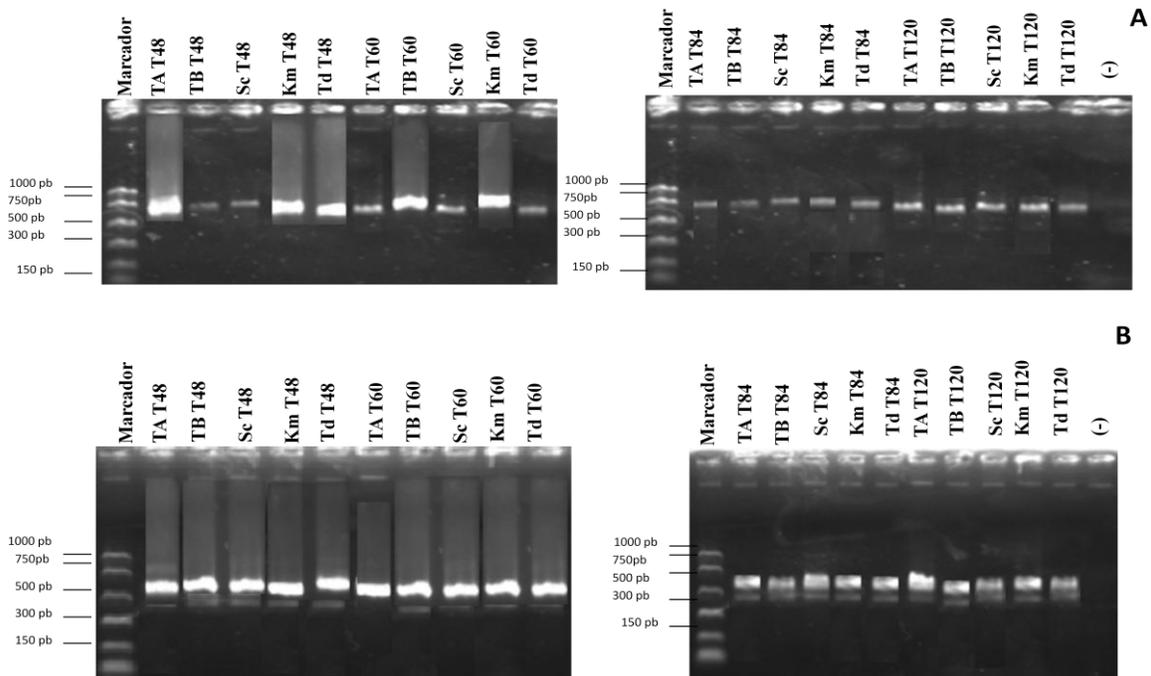


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación de las regiones (A) ITS y (B) 26S de las levaduras presentes en la fermentación. Donde TA es el inoculo de 1:1:1, TB el inoculo de 0.1:1:1 de *S. cerevisiae* (*Sc*), *K. marxianus* (*Km*) y *T. delbrueckii* (*Td*) acompañados del tiempo de toma de muestra.

Al mezclar los productos de PCR se pudo apreciar, aún en geles de agarosa (fig. 14) la separación de cada uno de los fragmentos de los tamaños amplificados de las regiones ITS y 26S, mostrando con ello la posibilidad de identificación sin problema alguno con base en el tamaño del fragmento de cada uno de las levaduras sometidas a estudio en esta investigación.

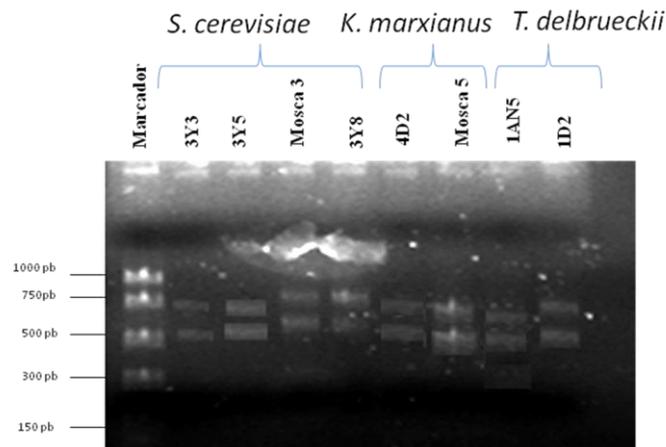


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa de la mezcla de los productos de PCR del 26S e ITS de las levaduras de estudio.

Los fragmentos amplificados de cada una de las regiones, ITS y 26S, fueron sometidos a SSCP para descartar algún tipo de polimorfismo presente en los organismos modelos empleados en el estudio, y con ello reafirmar la separación que se presenta entre los fragmentos amplificados de las dos regiones.

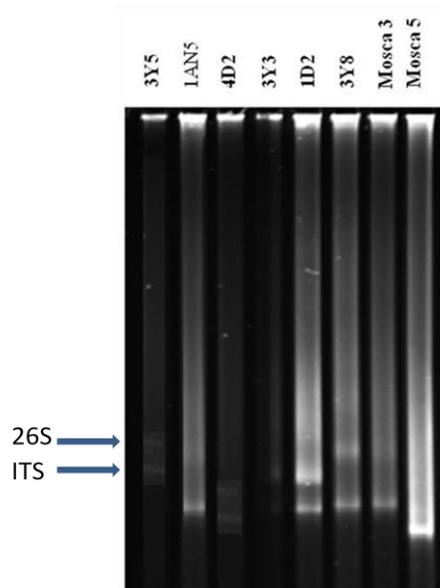


Figura 15. Análisis del polimorfismo de las levaduras utilizadas por medio de la técnica SSCP usando los oligonucleótidos ITS1 ITS4 y NL1 NL4. Las flechas indican la posición de las bandas ribosomales.

La figura 15 muestra la separación entre las regiones ITS y 26S observándose los fragmentos esperados, y corroborando que no hay productos mezclados, que pudieran confundirse en una sola banda.

VII.3. Diseño de sondas y estandarización del FISH

En las figuras 16 17 y 18 se muestran los alineamientos que se hicieron para las tres especies de levaduras analizadas en este trabajo, realizados con el programa CLC sequence viewer 5.

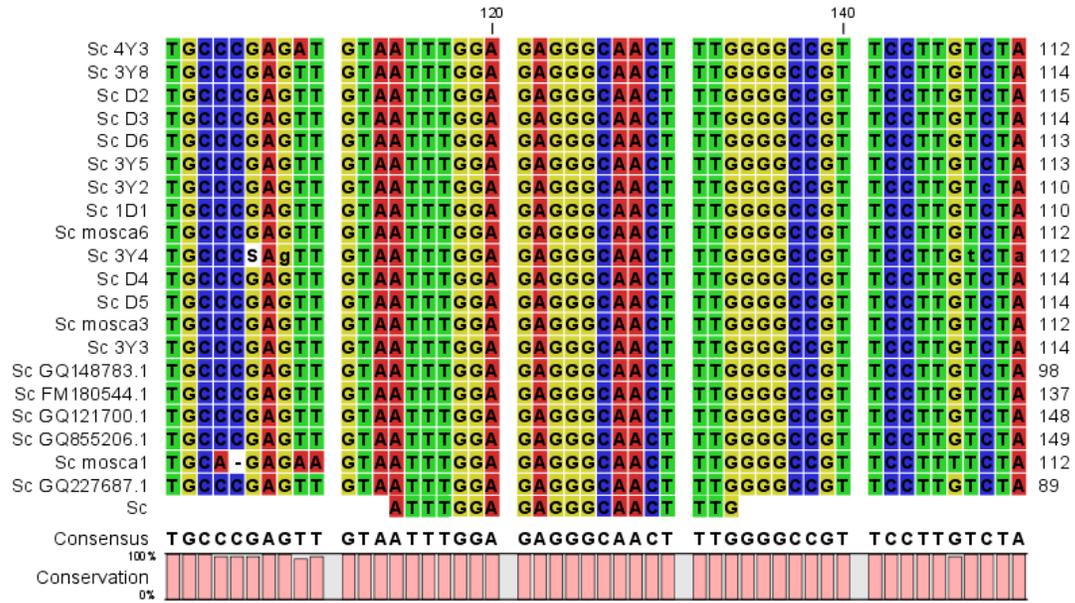


Figura 16. Alineamiento de la región conservada en las secuencias del 26S de 15 aislamientos de *S. cerevisiae* obtenidas de mostos de mezcal con secuencias reportadas en el NCBI.

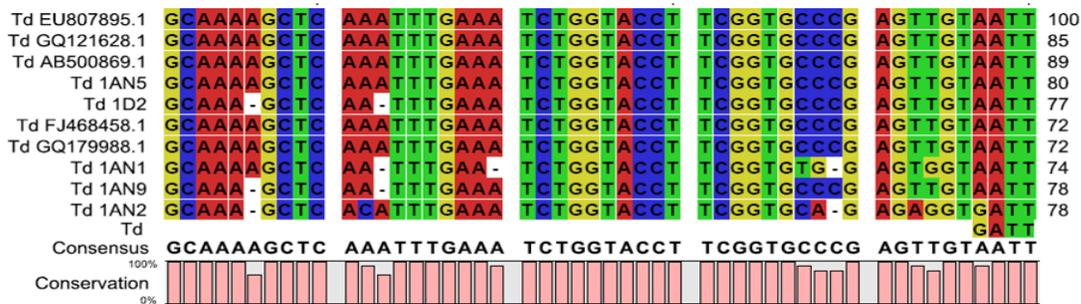


Figura 17. Alineamiento de la región conservada de las secuencias 26S de 5 aislamientos de *T. delbrueckii* obtenidos de mostos de mezcal con secuencias del NCBI.

En la figura 17, se muestra el alineamiento de las secuencias de la especie de *T. delbrueckii* con algunas secuencias del banco de datos del NCBI, en el cual se puede observar la zona de conservación entre las secuencias de la especie, la cual fue elegida como blanco para el diseño de la sonda específica para dicha especie.

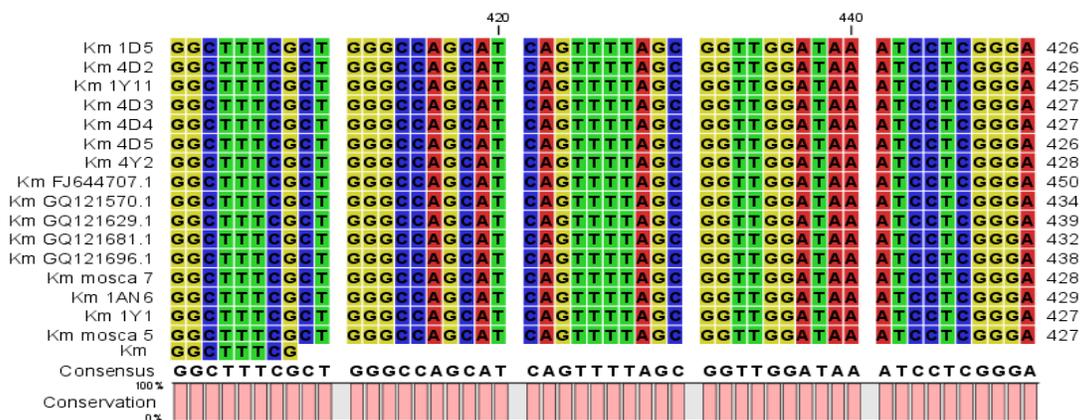


Figura 18. Alineamiento de la región conservada en las secuencias del 26S de 11 aislamientos de *K. marxianus* obtenidas de mostos de mezcal con secuencias reportadas en el NCBI.

Como resultado del análisis de las tres figuras anteriores, en el cuadro 12 se muestran las secuencias de las tres sondas generadas, así como la posición de localización de esta en la región 26S de cada una de las especies.

Cuadro 12. Secuencias de las sondas diseñadas en este trabajo para de las especies de levaduras probadas.

Sonda	Posición	Secuencia	Especie
KmP	D391	GCGTTTGCTTCGGCTTTTCGC	<i>K. marxianus</i>
ScP	D113	ATTTGGAGAGGGCAACTTTG	<i>S. cerevisiae</i>
TdP	D96	TTGGGGCTGGTCTTTGAAAA	<i>T. delbrueckii</i>

La optimización de las condiciones de hibridación se hizo bajo concentraciones de formamida de 35, 30, 25 y 10%, con el fin de seleccionar aquella concentración que permitiera la hibridación de la sonda en la célula y tuvieran una fluorescencia fuerte y definida tal como se muestra en la fig. 19, en la cual se observa que el DAPI permite visualizar el núcleo y las células presentes en la muestra, ScX (sonda para *S. cerevisiae*) que fluorescen intensamente, la sonda EUK muestra la totalidad de las células presentes en la muestra al igual que FUNK (apéndices 3 y 4).

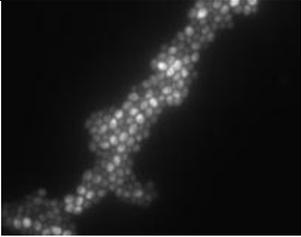
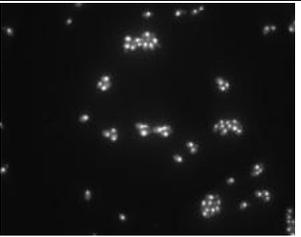
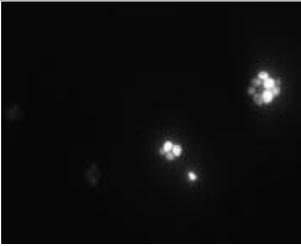
DAPI	Sc X	EUK	Concentración de formamida (%)
			35
			30
			25
			10

Figura 19. Microfotografías de las diferentes concentraciones de formamida utilizadas para la estandarización de FISH con las sondas reportadas DAPI, ScX y EUK. Objetivo 100X.

De acuerdo a los resultados obtenidos se decidió trabajar con una concentración de formamida al 30% en la que se obtuvo la mejor señal de fluorescencia y una buena hibridación de la sonda con la célula de las levaduras. Las sondas propuestas y reportadas por Xufre *et al* (2006) fueron utilizadas para la estandarización de la detección en mezclas de especies a concentraciones conocidas, y en las figuras 20 y 21 se muestran las relaciones de inóculo y sondas utilizadas para llevar a cabo dicha estandarización.

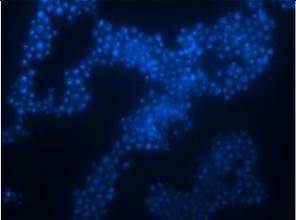
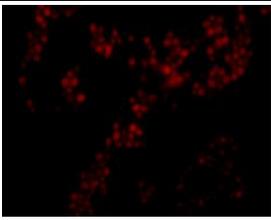
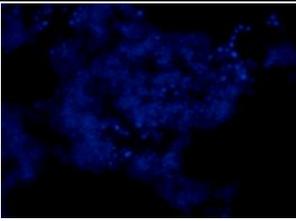
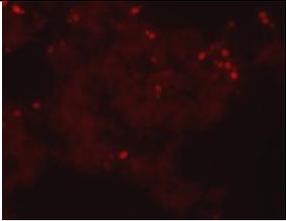
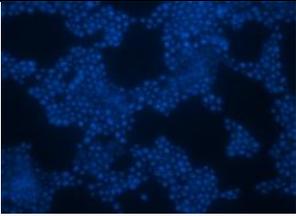
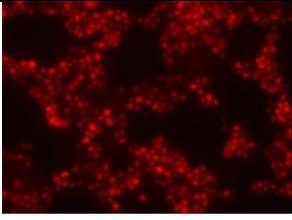
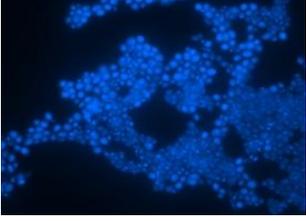
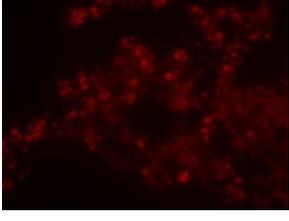
DAPI	Sc X	Relación Sc/Td	Porcentaje de fluorescencia
		1/1	56
		1/9	13
		9/1	93
		1/1	53

Figura 20. Microfotografías y porcentaje de detección calculado de la mezcla entre Sc 3Y8 y Td 1AN5, utilizando la sonda específica para *Saccharomyces cerevisiae*. Objetivo 100X.

Las imágenes y el porcentaje de detección de la especie en cuestión calculado a partir del área fluorescente demuestran que la especificidad de las sondas se mantiene aun durante las mezclas realizadas en este estudio. Es posible ver que en las diluciones realizadas proporciona la cantidad o porcentaje de señal esperado ya sea este un 10 o 90%. En la figura 20 se presenta la visualización de la especificidad presentada por la sonda utilizada (Sc X), teniendo que la fluorescencia esperada del 50% debido a que la mezcla de los

organismos era 1/1 por tanto se aprecia que aproximadamente un 50 % de células presentaban fluorescencia con respecto a la imagen tomada con DAPI.

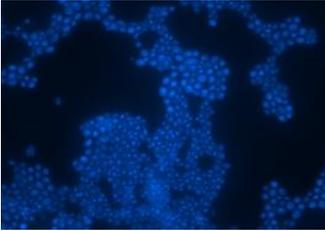
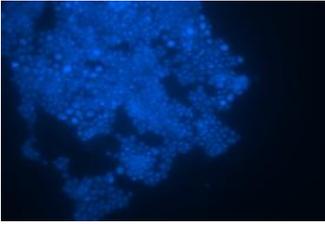
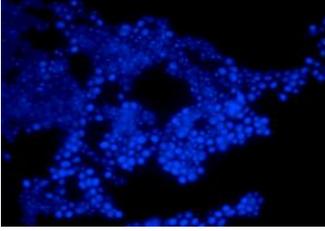
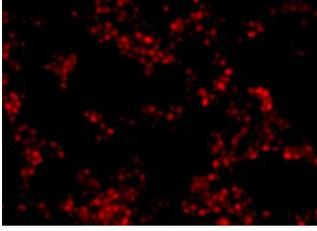
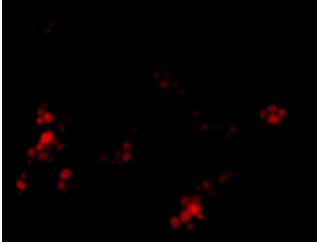
DAPI	Sonda TdX	Relación Sc/Td	Porcentaje de fluorescencia
		1/1	43
		1/9	8
		9/1	91
		1/1	54

Figura 21. Microfotografías y porcentaje de detección calculado de la mezcla entre Td 1AN5 y Sc 3Y8 y utilizando la sonda específica para *Torulaspota delbrueckii*. Objetivo 100X.

En la figura 21 se observa de manera experimental la comprobación de la especificidad de cada una de las sondas de acuerdo a la especie para la que fueron diseñadas. Mostrando

valores muy cercanos a los esperados por la relación en la mezcla diseñada con concentraciones conocidas, esto de acuerdo a las áreas tomadas. Con esto se demuestra que existe una alta especificidad en las sondas reportadas por Xufre *et al.* (2006) para *S. cerevisiae*, y una especificidad media para *T. delbrueckii*.

VII.4. Cinética de la fermentación en medio sintético

La concentración de azúcares iniciales fue estandarizado a 100 g L^{-1} , análogo a la concentración utilizada en las fermentaciones con mosto de uva. Se caracterizó una fermentación con inóculos diferentes, el primero, a una relación 1:1:1 de *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *T. delbrueckii* (equivalente a $1 \times 10^4 \text{ cel mL}^{-1}$ para cada una de ellas) y el otro en relación 0.1:1:1, obteniendo un consumo de azúcares así como la producción de etanol y glicerol muy similares entre los diferentes tratamientos (Fig. 22). Es importante mencionar que al término de la fermentación aún queda fructosa en el sistema, lo que indica que la fermentación es incompleta, sin embargo, se muestra una buena producción de etanol (aprox. 45 g L^{-1} en ambos casos).

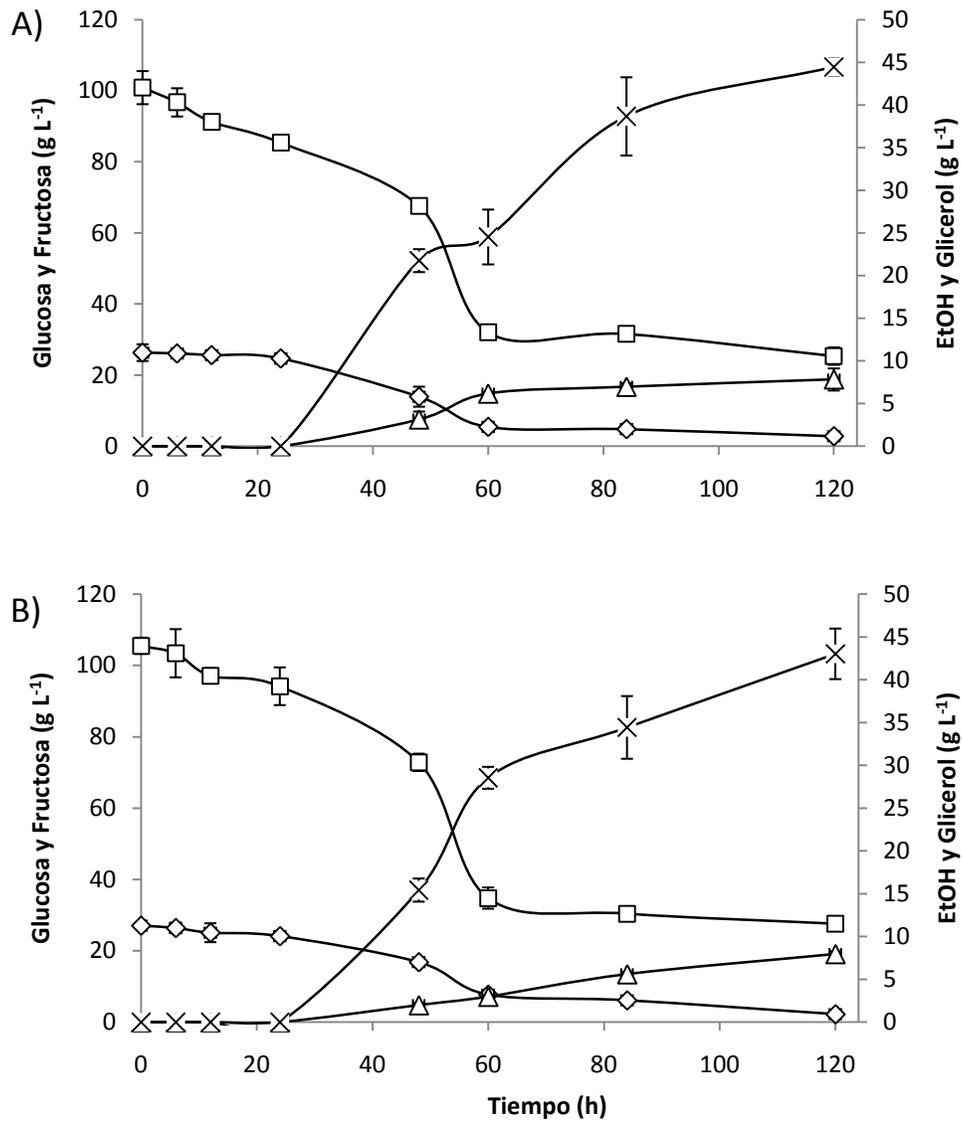


Figura 22. Cinética de fermentación en medio sintético de cultivo con inóculo mixto de *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *T. delbrückii* mezclados a una relación inicial de: (A) 1: 1: 1, y (B) 0.1: 1: 1. Donde \diamond - Glucosa, \square - Fructosa, Δ Glicerol, \times Etanol.

Adicionalmente a estos resultados, la producción de biomasa permitió calcular los rendimientos del cultivo en medio sintético, que se muestran a continuación en el cuadro 13.

Cuadro 13. Parámetros cinéticos de la fermentación llevada a cabo con medio sintético a dos inóculos diferentes de *S. cerevisiae*:*K. marxianus*:*T.delbrueckii*.

Tiempo	Inóculo 1:1:1			Inóculo 0.1:1:1		
	$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹)	$Y_{EtOH/s}$ (g g ⁻¹)	$Y_{glic/s}$ (g g ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹)	$Y_{EtOH/s}$ (g g ⁻¹)	$Y_{glic/s}$ (g g ⁻¹)
60	0.03	0.27	0.07	0.03	0.32	0.03
120	0.07	0.45	0.08	0.05	0.42	0.08

Donde $Y_{x/s}$ es el rendimiento celular, $Y_{EtOH/s}$ el rendimiento de etanol y $Y_{glic/s}$ el rendimiento de glicerol

Los resultados obtenidos para la tasa de crecimiento específica, fueron para el inóculo 1:1:1 de 0.0025 h⁻¹ y de 0.0015 h⁻¹ para el inóculo de 0.1:1:1, que indica que el crecimiento fue escaso en ambos sistemas, sin embargo, las células tuvieron un buen rendimiento de etanol y soportaron concentraciones medias de ese metabolito, con valores máximos de alrededor de 45 g L⁻¹.

VII.4.1. Caracterización de la dinámica poblacional en medio sintético

Para el análisis de la dinámica de las poblaciones de cada una de las levaduras en los inóculos mixtos, se cuantificaron las áreas celulares totales con la sonda DAPI utilizando un nivel de detección tal que toda la célula fluoresciera, y no solamente los núcleos como está descrito para esta sonda, de manera que el tamaño por fluorescencia fuera comparable con los resultados puntuales con cada una de las sondas específicas empleadas (ScX, KmX y TdX). A continuación se muestra el seguimiento de las dinámicas poblacionales durante la fermentación en medio sintético, con los dos inóculos probados. Como puede apreciarse en la figura 23 y 24, para cada uno de los inóculos mixtos probados, el cambio en las áreas detectadas por la técnica de FISH tuvo una correlación con los datos arrojados por el conteo celular, que se muestran en las mismas gráficas. Así como el seguimiento celular que muestran las células conforme transcurre el tiempo de la fermentación.

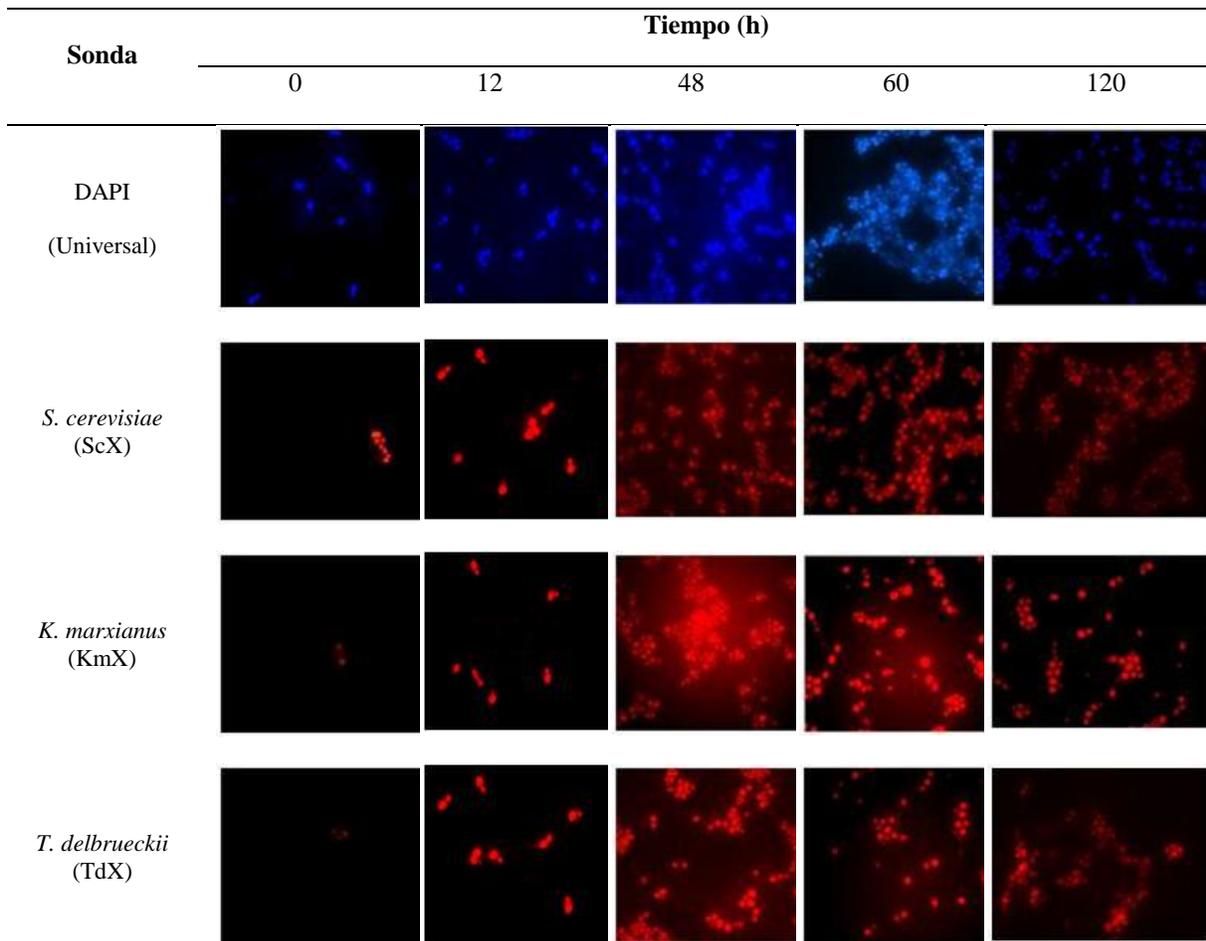
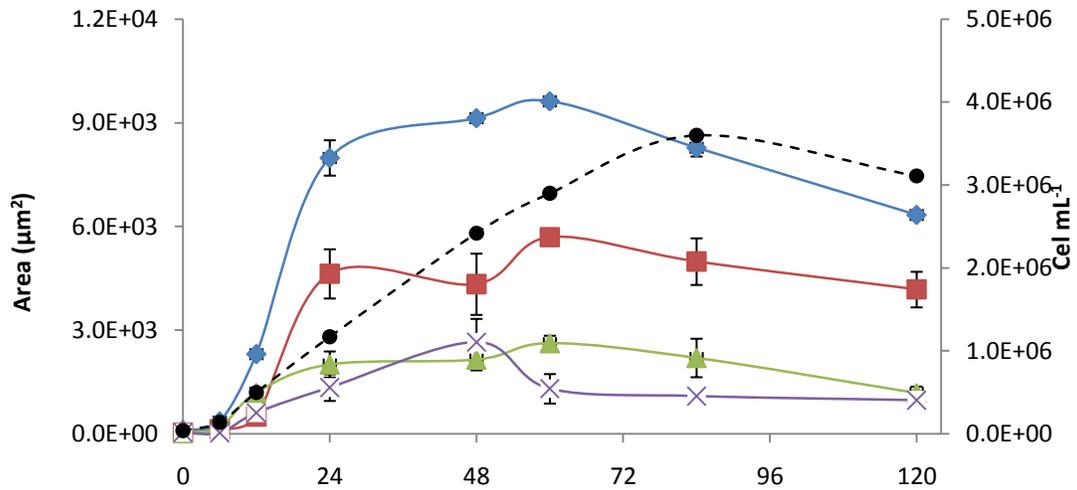
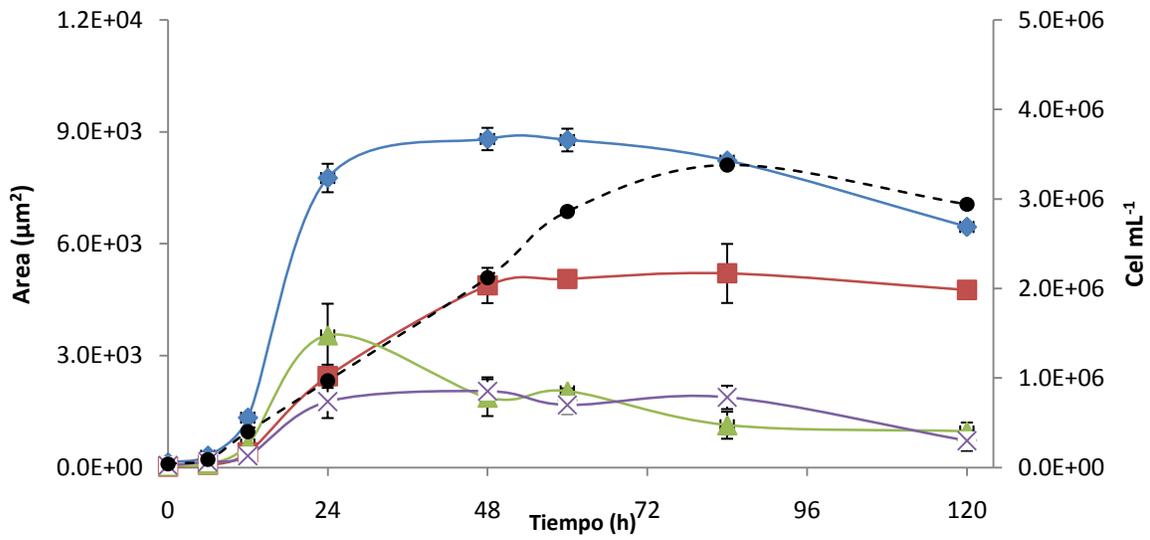


Figura 23. Dinámica poblacional durante la fermentación en medio sintético con inóculo en mezcla 1:1:1 de *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *T. delbrueckii*. ▲-Km, ■-Sc, ♦-DAPI, ×-Td, ●-cel mL⁻¹. En la parte inferior microfotografías que muestran el seguimiento celular conforme avanza el tiempo de fermentación.



Sonda	Tiempo (h)				
	0	12	48	60	120
DAPI (Universal)					
<i>S. cerevisiae</i> (ScX)					
<i>K. marxianus</i> (KmX)					
<i>T. delbrueckii</i> (TdX)					

Figura 24. Dinámica poblacional durante la fermentación en medio sintético con inóculo en mezcla 0.1 de *S. cerevisiae*, y 1:1 de *K. marxianus* y *T. delbrueckii*. ▲-Km, ■-Sc, ◆-DAPI, X-Td, •-cel mL⁻¹. En la parte inferior microfotografías que muestran el seguimiento celular conforme avanza el tiempo de fermentación.

En el caso de células totales los resultados obtenidos son similares en ambos inóculos, aún a pesar de la diferencia de inóculo inicial de *Saccharomyces cerevisiae*, es decir, esa concentración celular de (3×10^6 cel mL⁻¹) es la máxima que se puede lograr con la composición de medio de cultivo utilizado. De igual manera apreciamos que el nivel máximo de las otras dos especies no excede de 1×10^6 cel/mL⁻¹. Sin embargo, se observa también como es que *T. delbrueckii* y *K. marxianus* presentan cambios en sus concentraciones celulares sin pasar el valor máximo anteriormente mencionado, mientras que *S. cerevisiae* presenta cambios positivos en su concentración celular logrando así un valor máximo mayor al de las otras especies y dominando así el medio de la fermentación.

VII.4.2. Detección de las levaduras durante la fermentación mediante la técnica ARISA en medio sintético

El análisis de los espaciadores intergénicos ribosomales fue llevado a cabo para verificar la presencia de las especies de levaduras utilizadas en el inóculo inicial, y como estándares de comparación se hicieron cultivos individuales de cada una de las 3 levaduras y se realizó la extracción de ADN durante todos los puntos de la cinética de fermentación, obteniéndose que el tamaño esperado, de acuerdo a las determinaciones por secuenciación, de los fragmentos para el 26S de *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *T. delbrueckii* son de 570, 533 y 584 pb, respectivamente, y los tamaños esperados para el ITS son 711, 678 y 674 pb, respectivamente. Sin embargo, los resultados de los fragmentos obtenidos de las regiones ITS como 26S de las levaduras analizadas en este estudio presento una variación de 1 a 14 pb para los rangos de fragmentos considerados. Como se puede apreciar en los cuadros 14 y 15, para el 26S, dependiendo del tiempo de fermentación, no solo fue posible ó no detectar a cada una de las especies inoculadas, sino que además fue posible observar cambios en los valores de fluorescencia relativos que no presentaron correlación con su cuenta celular. La región ribosomal amplificada (ITS1-5.8S-ITS2) no fue detectada por esta técnica en muchos de los puntos de la cinética para *K. marxianus* y *T. delbrueckii*, infiriendo que la TM de amplificación no es adecuada ó el oligonucleótido utilizado no es tan específico como para *S. cerevisiae*, requiriéndose probablemente un paso extra de optimización para lograr su visualización.

Cuadro 14. Detección de especies en medio sintético mediante la técnica ARISA, inóculo *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *T. delbrueckii* en mezcla 1 : 1 : 1.

Tiempo	26S						ITS					
	Tamaño obtenido en ABI (pb)			Unidades relativas de fluorescencia (RFU's)			Tamaño obtenido en ABI (pb)			Unidades relativas de fluorescencia (RFU's)		
	Sc	Km	Td	Sc	Km	Td	Sc	Km	Td	Sc	Km	Td
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	569	558	0	1182	150	0	713	0	0	865	0	0
12	569	553	584	656	357	4671	711	0	670	1623	0	104
24	569	0	583	3151	0	5650	0	0	0	0	0	0
48	569	556	584	3532	118	4148	711	692	0	1955	168	0
60	570	558	584	3110	161	6080	711	0	0	176	0	
84	570	550	584	2062	114	499	709	0	0	194	0	0
120	569	0	584	1037	0	101	712	0	0	3995	0	0

El tamaño esperado de los fragmentos, de acuerdo a las determinaciones por secuenciación, para el 26S de *S.cerevisiae*, *K. marxianus* y *T. delbrueckii* son de 570, 533 y 584 pb, respectivamente, y los tamaños esperados para el ITS son 711, 678 y 674 pb, respectivamente.

Cuadro 15. Detección de especies en medio sintético mediante la técnica ARISA, inóculo *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *T. delbrueckii* en mezcla 0.1 : 1 : 1.

Tiempo	26S						ITS					
	Tamaño obtenido en ABI (pb)			Unidades relativas de fluorescencia (RFU's)			Tamaño obtenido en ABI (pb)			Unidades relativas de fluorescencia (RFU's)		
	Sc	Km	Td	Sc	Km	Td	Sc	Km	Td	Sc	Km	Td
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	570	548	584	765	344	6366	709	0	0	1273	0	0
12	565	550	584	1368	343	1710	710	0	0	2860	0	0
24	569	0	583	1014	0	6208	0	0	0	0	0	0
48	569	0	584	219	0	7062	709	0	0	845	0	0
60	570	550	584	808	216	4052	710	0	0	1449	0	0
84	570	0	584	164	0	447	711	0	0	1433	0	0
120	569	551	0	2101	154	0	711	0	0	2011	0	0

El tamaño esperado de los fragmentos, de acuerdo a las determinaciones por secuenciación, para el 26S de *S.cerevisiae*, *K. marxianus* y *T. delbrueckii* son de 570, 533 y 584 pb, respectivamente, y los tamaños esperados para el ITS son 711, 678 y 674 pb, respectivamente.

VII.5. Cinética de la fermentación en medio de mosto

Los experimentos en cultivos con inóculo mixto en medio de mosto (Fig. 25) mostraron que la producción de etanol fue menor que la alcanzada en el medio sintético (Fig. 22).

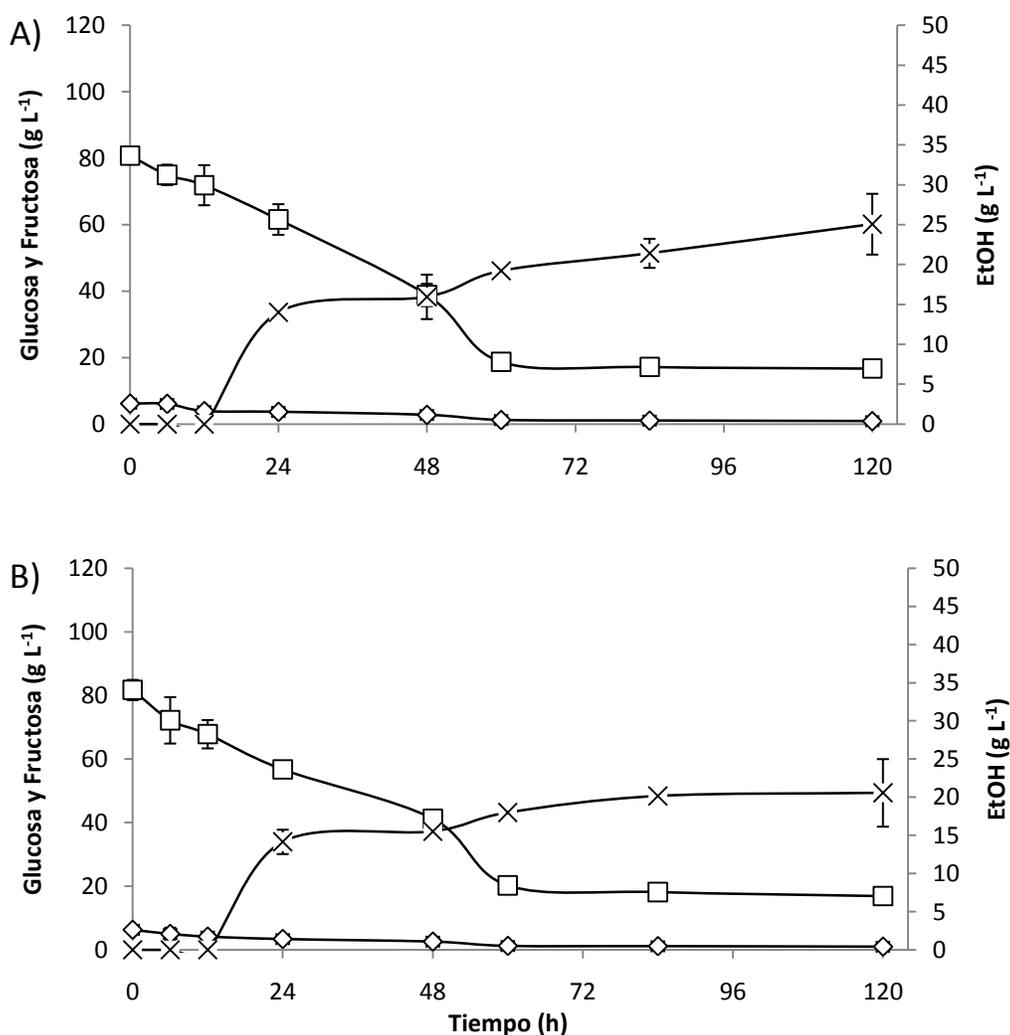


Figura 25. Cinética de fermentación en medio de mosto con inóculo mixto de *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *T. delbrueckii* mezclados a una relación inicial de: (A) 1: 1: 1, y (B) 0.1:1:1. Donde: \diamond - Glucosa, \square - Fructosa, y \times - Etanol.

Es importante resaltar que no fue posible medir en el medio de mosto la concentración de glicerol, debido a que su composición, aún a diluciones mayores a 1:100, presenta una interferencia en las lecturas en el HPLC precisamente en el tiempo de retención de éste

metabolito (aprox. 14 min) como puede apreciarse en el apéndice 8 en el cual se observa un cierto traslape de algún otro metabolito que genera resultados incorrectos, por lo que se omitió su cuantificación en esta sección. También es de hacer notar que el medio de mosto tuvo una muy baja concentración de glucosa, siendo principalmente fructosa el azúcar presente. La producción de etanol arrancó desde las 12 horas en ambos inóculos, pero la producción máxima fue aproximadamente menor en 20 g L^{-1} que en medio sintético. Para dicho análisis también se consiguió el valor de rendimiento de productos como etanol y glicerol así como el rendimiento celular producido durante la fermentación tal y como se muestra en el cuadro 16.

Cuadro 16. Parámetros cinéticos de la fermentación llevada a cabo en medio de mosto a dos inóculos diferentes de *S. cerevisiae*:*K. marxianus*:*T. delbrueckii*.

Tiempo (h)	Inóculo 1 : 1 : 1		Inóculo 0.1 : 1 : 1	
	$Y_{x/s} \text{ (g g}^{-1}\text{)}$	$Y_{\text{EtOH}/S} \text{ (g g}^{-1}\text{)}$	$Y_{x/s} \text{ (g/g)}$	$Y_{\text{EtOH}/S} \text{ (g g}^{-1}\text{)}$
60	0.04	0.29	0.04	0.27
120	0.06	0.36	0.05	0.29

Donde $Y_{x/s}$ es el rendimiento celular y $Y_{\text{EtOH}/S}$ el rendimiento de etanol

Al igual que en el medio sintético, la producción de biomasa no fue favorecida por el medio de mosto debido a las altas concentraciones de azúcares y bajo nitrógeno, obteniéndose tasas específicas de crecimiento, para el caso del inóculo 1:1:1 de 0.0034 h^{-1} , mientras que para el inóculo 0.1:1:1 fue de 0.0012 h^{-1} . Para conocer el comportamiento de cada una de las levaduras utilizadas, y el impacto que el medio de mosto tenía sobre sus cinéticas de crecimiento, las levaduras fueron cultivadas de manera individual en dicho medio, comparándose sus cinéticas así como sus rendimientos (cuadro 17). Se aprecia en la figura 26 (A, B y C) que las tres levaduras son capaces de asimilar el medio sin llegar a consumir completamente la fructosa, y produciendo etanol en cantidades variables, siendo *T. delbrueckii* la mejor en el medio probado.

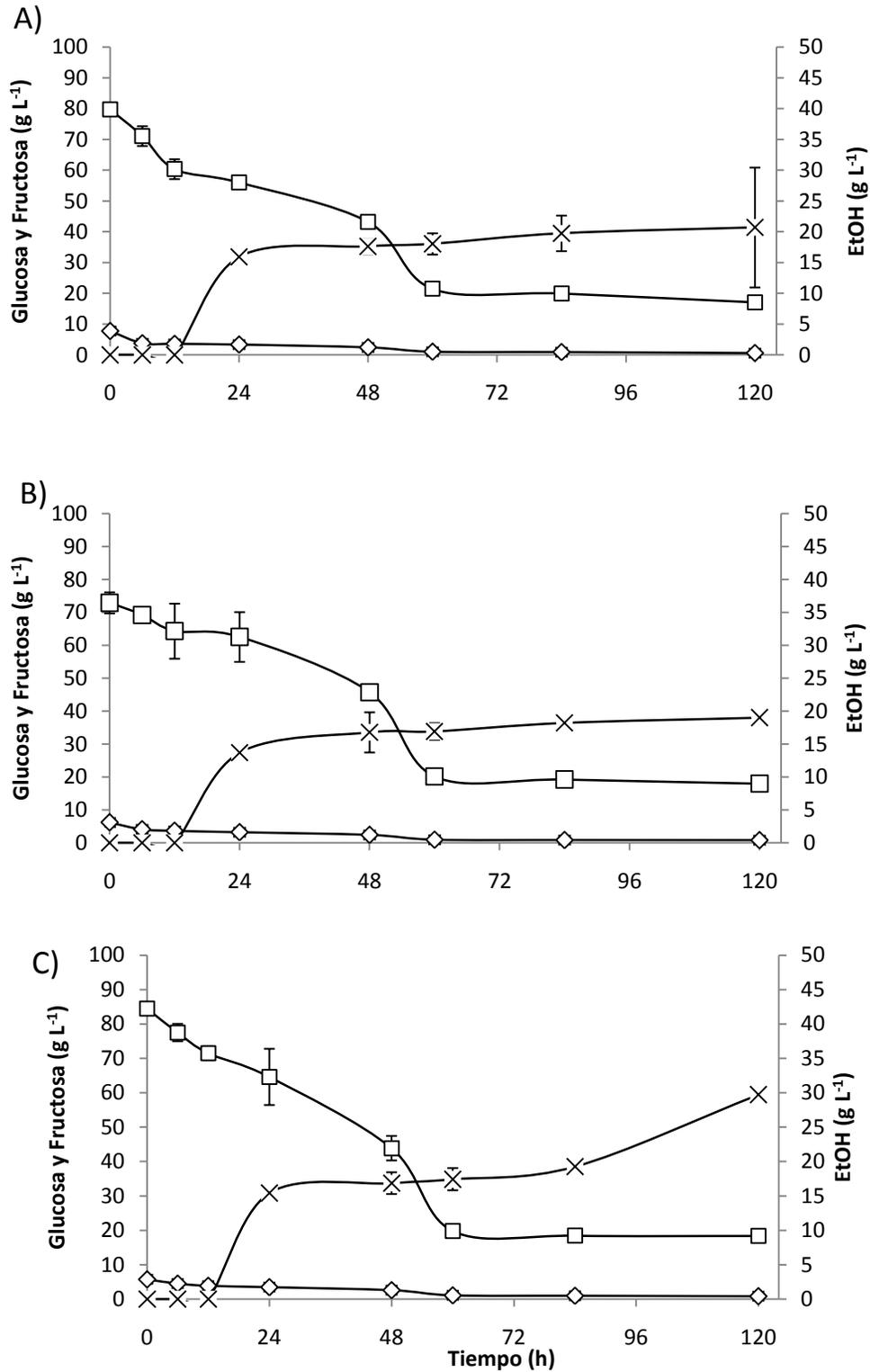


Figura 26. Cinética de fermentación individuales en medio de mosto de cada levadura analizada: (A) *S. cerevisiae*, (B) *K. marxianus*, (C) *T. delbrueckii*. Con un inóculo de 1×10^4 cel mL⁻¹ para las 3 especies. Donde: \diamond - Glucosa, \square - Fructosa, y \times - Etanol.

En cuanto a su desempeño a las 60 y 120 horas para cada una de las tres levaduras, se aprecia que, a diferencia de lo observado en los inóculos mixtos, los rendimientos son mayores cuando se cultivan de manera individual en el medio de mosto, siendo *T. delbrueckii* la que más se acerca al rendimiento teórico máximo del etanol producido con hexosas al final del cultivo, datos mostrados en el cuadro 17 donde podemos observar los rendimientos de producto como el de etanol y el rendimiento de celular producido.

Cuadro 17. Parámetros cinéticos de la fermentación llevada a cabo en medio de mosto por las levaduras de manera individual.

Tiempo (h)	<i>S. cerevisiae</i>		<i>K. marxianus</i>		<i>T. delbrueckii</i>	
	$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹)	$Y_{EtOH/S}$ (g g ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹)	$Y_{EtOH/S}$ (g g ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹)	$Y_{EtOH/S}$ (g g ⁻¹)
60	0.04	0.28	0.04	0.29	0.03	0.25
120	0.06	0.30	0.05	0.32	0.04	0.42

Donde $Y_{x/s}$ muestra el rendimiento celular y $Y_{EtOH/S}$ el rendimiento de etanol

Las tasas específicas de crecimiento, al igual que en medio sintético, fueron muy bajas, con un valor de 0.0016 h⁻¹ para *S. cerevisiae*, 0.0013 h⁻¹ para *T. delbrueckii*, y la máxima se observó para *K. marxianus* con un valor de 0.029 h⁻¹. Es decir, esta última fue la que pudo aprovechar con mayor eficiencia el medio de mosto para producción de biomasa.

VII.5.1. Caracterización de la dinámica poblacional en medio de mosto

El seguimiento de las dinámicas poblacionales por medio de la técnica FISH, al igual que en caso de las cinéticas en medio sintético, mostraron patrones de cambio en la concentración de cada una de las especies de levaduras probadas que correlacionaban con el cambio global de la concentración celular cuantificada por conteo en cámara de Neubauer, así como también se puede observar en las microfotografías tomadas durante el proceso fermentativo (fig. 27).

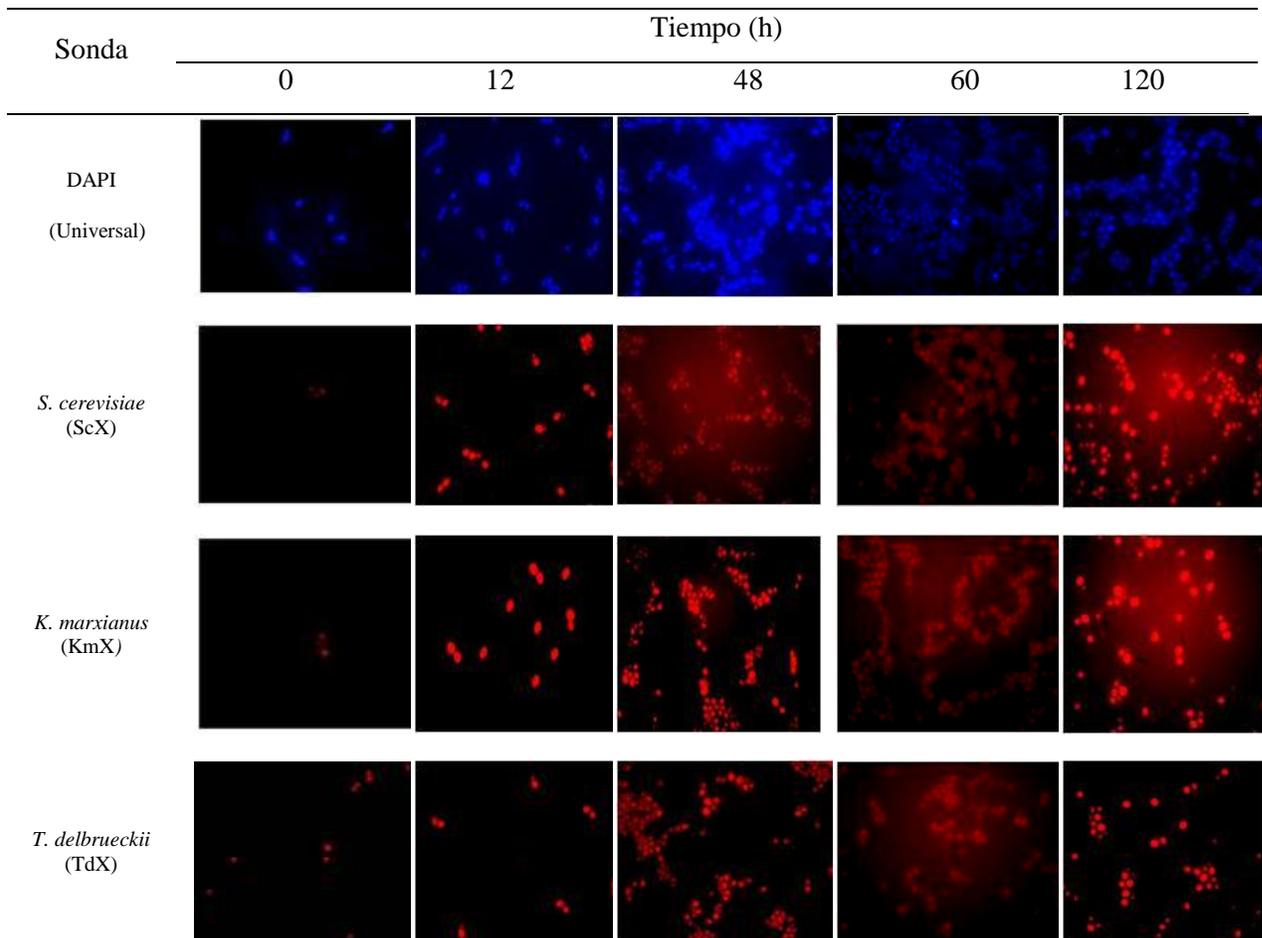
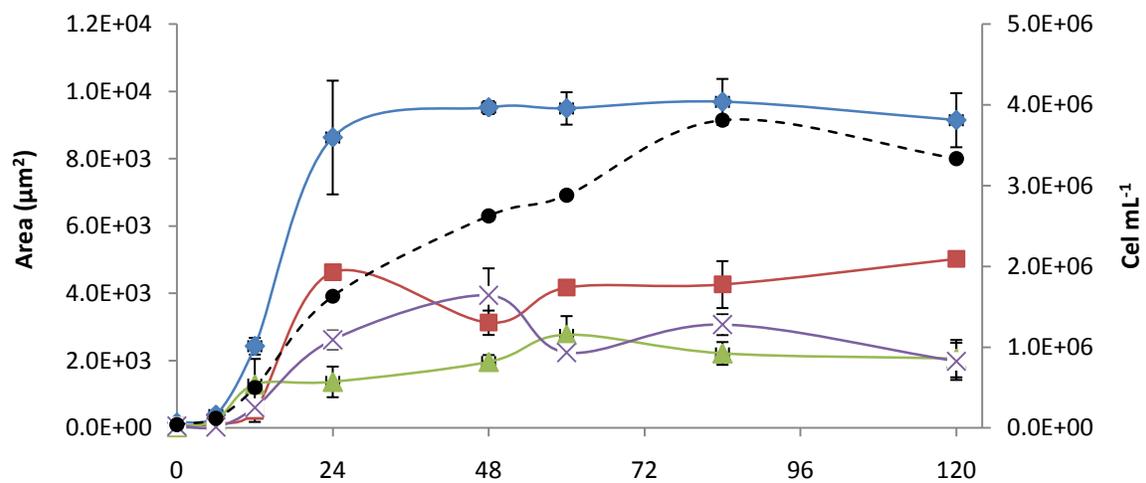


Figura 27. Dinámica poblacional durante la fermentación en medio de mosto con inóculo en mezcla de 1:1:1 de *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *T. delbrueckii*. ▲ Km, ■ Sc, ◆ DAPI, X Td, • -cel mL⁻¹. En la parte inferior microfotografías que muestran el seguimiento celular conforme avanza el tiempo de fermentación.

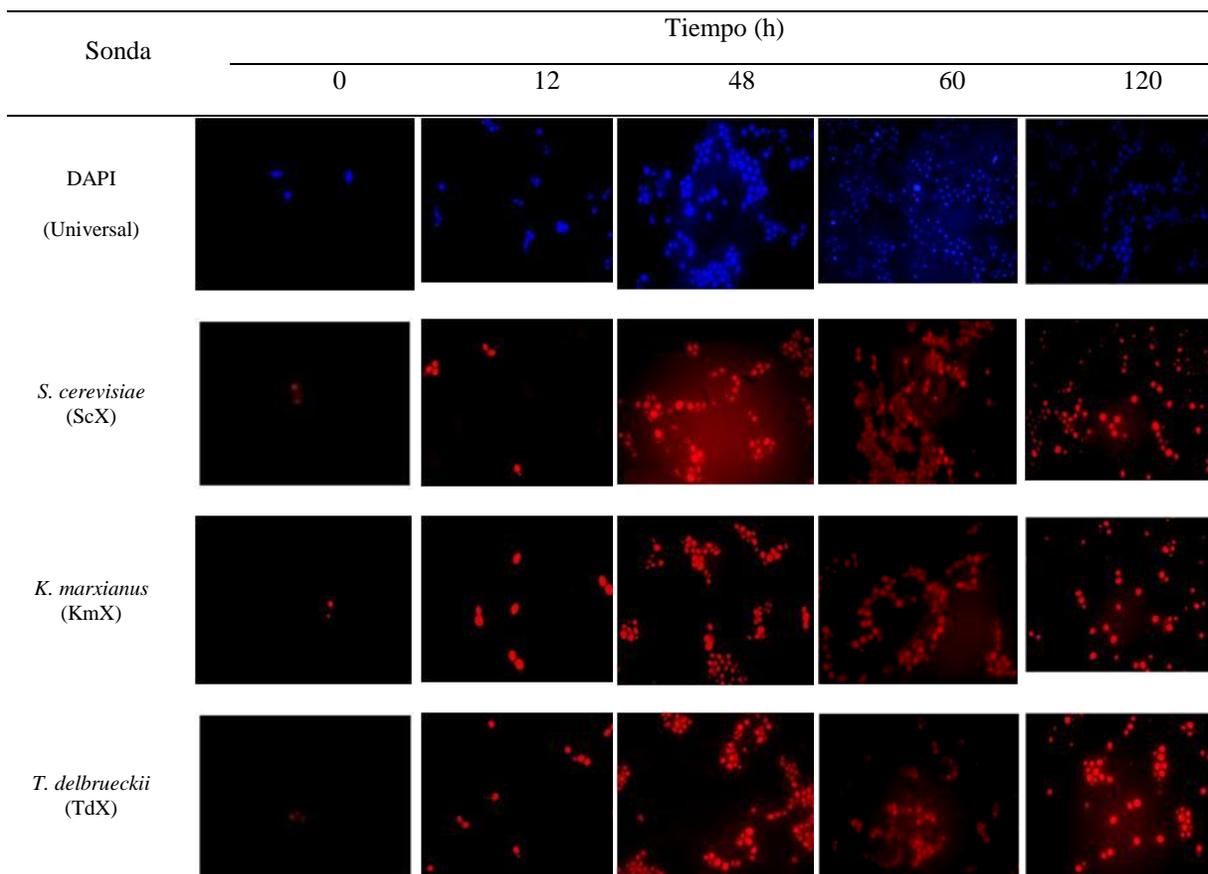
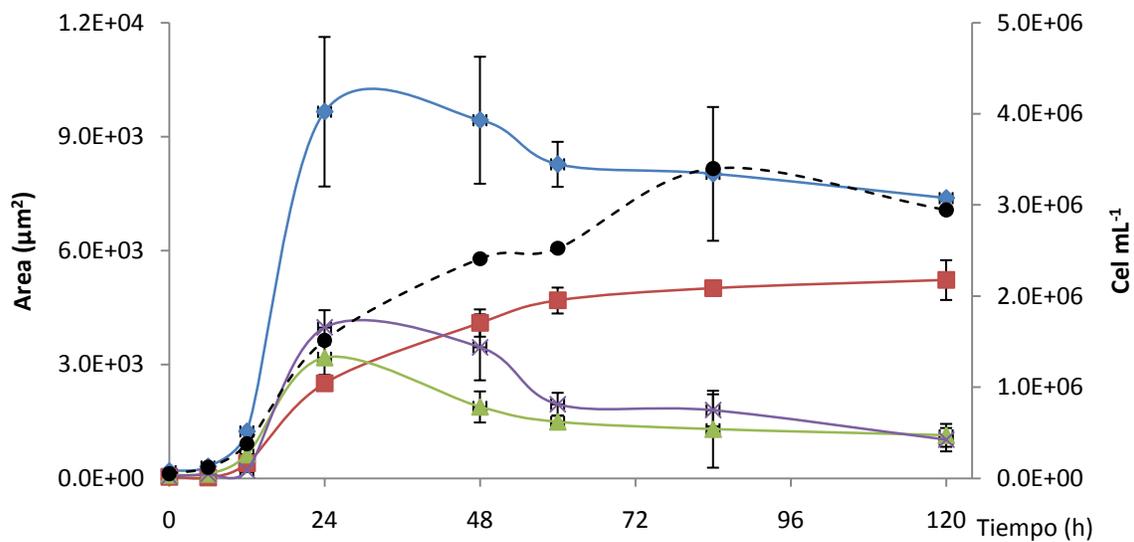


Figura 28. Dinámica poblacional durante la fermentación en medio de mosto con inóculo en mezcla de 0.1 de *S. cerevisiae*, y 1:1 de *K. marxianus* y *T. delbrueckii*. ▲ Km, ■ Sc, ◆ DAPI, X Td, ● -cel mL⁻¹. En la parte inferior microfotografías que muestran el seguimiento celular conforme avanza el tiempo de fermentación.

Para la concentración de células totales, los resultados obtenidos son similares en ambos inóculos iniciales, alcanzando un nivel máximo cercano a 4×10^6 cel mL⁻¹, es decir, ligeramente mayor que en caso del medio sintético. Observando que al final de la fermentación dicho nivel máximo se mantiene para el caso del inóculo de igual concentración, mientras que para el otro muestra una depleción llegando esta a 3×10^6 cel mL⁻¹. Para el caso de *S. cerevisiae*, se observa que, cuando se utiliza el inóculo 1:1:1 de las 3 levaduras, ésta predomina rápidamente desde el inicio de la fermentación, mientras que en el inóculo en donde es una décima parte de las otras 2 levaduras, le tomo aproximadamente 48 horas superar a *K. marxianus* y *T. delbrueckii*, mostrando con ello el dominio de dicha especie sobre el resto.

De igual manera observamos como es que en el inóculo 1:1:1, alrededor de las 48 h del proceso fermentativo, *S. cerevisiae* presenta cambios en la concentración celular al igual que las otras dos especie, mostrando un ligero declive. Sin embargo es a partir de esa hora que dicha especie domina el medio fermentativo dejando a *K. marxianus* y *T. delbrueckii* en niveles menores de 1×10^6 cel mL⁻¹. Cabe mencionar que en ambos inóculos mixtos, una vez que la concentración de etanol en el medio se incrementa es marcada la muerte de las levaduras de la especie *K. marxianus* y *T. delbrueckii* manteniéndose solo *S.cerevisiae*, la cual es conocida por soportar un mayor estrés por altas concentraciones de etanol en el medio de fermentación.

Durante las fermentaciones individuales de cada de una de las especies en mosto de agave con un inóculo de 1×10^4 cel mL⁻¹ también se hizo la caracterización de las dinámicas poblacionales por FISH (fig. 29), observándose que las tres levaduras presentan una caída en la señal de fluorescencia a las 48 h, que coincide con la depleción de la glucosa en el medio e inicio de la fase de mayor velocidad de consumo de fructosa. La razón de este comportamiento requiere mayor estudio.

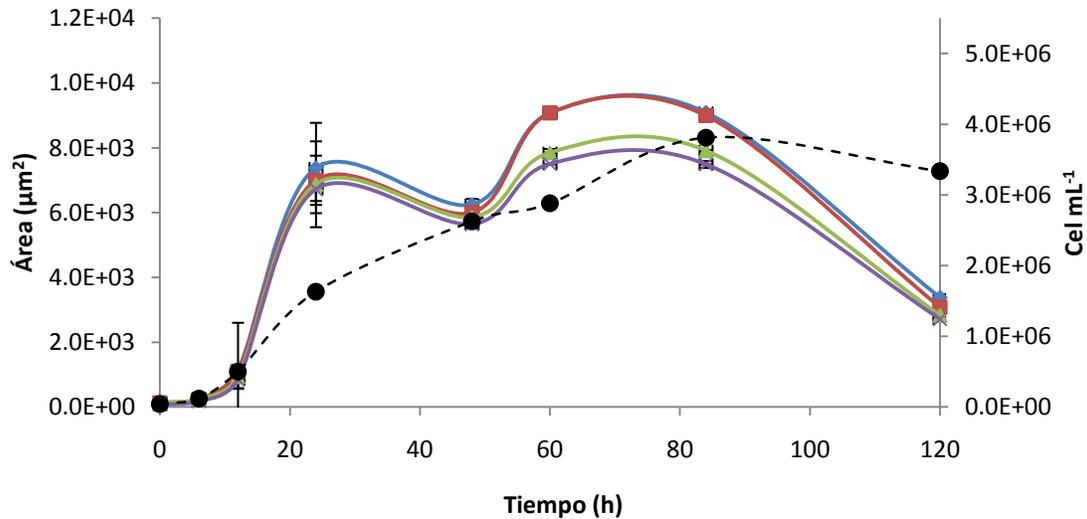


Figura 29. Seguimiento poblacional durante la fermentación en medio de mosto de cada levadura cultivada de manera individual y con la misma concentración inicial de inóculo. ▲ Km, ■ Sc, ◆ DAPI, × Td, ● -cel mL⁻¹.

Observamos que cuando las especies son inoculadas por separado los niveles máximos alcanzados de las tres especies son alrededor de 3 y 4 x 10⁶ cel mL⁻¹, mientras que el conteo en cámara de Neubauer es muy similar a las fermentaciones realizadas en mezcla con valores de 3 x 10⁶ cel mL⁻¹.

VII.5.2. Detección de las levaduras durante la fermentación mediante la técnica ARISA en medio de mosto

De manera similar que en el medio sintético se obtuvo la extracción de ADN metagenómico de cada una de las muestras tomadas durante el transcurso de la fermentación realizada en medio de mosto inoculado con las tres levaduras principales de la fermentación del mosto de mezcal.

Como ya fue mencionado anteriormente para los resultados de medio sintético, el tamaño esperado de los fragmentos, de acuerdo a las determinaciones por secuenciación, para el 26S

de *S.cerevisiae*, *K. marxianus* y *T. delbrueckii* son de 570, 533 y 584 pb, respectivamente, y los tamaños esperados para el ITS son 711, 678 y 674 pb, respectivamente. Como se puede apreciar en los cuadros 18 y 19, en el medio de mosto, en las primeras 24 horas no fue posible extraer, y por lo tanto amplificar con ninguno de los dos pares de oligonucleótidos, el ADN del medio, probablemente debido a una misma interferencia por la misma composición del mosto. Sin embargo, a partir de la muestra de 48 horas fue posible visualizar los productos, aunque la fluorescencia relativa no mostró ninguna tendencia en sus valores, a diferencia de lo observado para el caso de las cinéticas en medio sintético.

En el medio de mosto además fue realizado el seguimiento de las cinéticas individuales de cada una de las levaduras, y al igual que en lo descrito anteriormente, no fue posible extraer ADN antes de las 48 horas de cultivo, sin embargo, a partir de ese tiempo, se logra la correcta identificación de las especies en cada medio como se puede apreciar en el cuadro 20.

Cuadro 18. Detección de las especies *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *T. delbrueckii* en medio de mosto mediante la técnica ARISA, inóculo en mezcla 1:1:1.

Tiempo	26S						ITS					
	Tamaño obtenido en ABI (pb)			Unidades relativas de fluorescencia (RFU's)			Tamaño obtenido en ABI (pb)			Unidades relativas de fluorescencia (RFU's)		
	Sc	Km	Td	Sc	Km	Td	Sc	Km	Td	Sc	Km	Td
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	581	0	584	625	0	631	711	696	0	1471	367	0
60	565	546	583	512	274	6463	711	681	660	764	4013	418
84	580	0	584	1342	0	1225	711	676	0	7131	954	0
120	580	548	584	7327	998	7340	710	0	0	5909	0	0

El tamaño esperado de los fragmentos, de acuerdo a las determinaciones por secuenciación, para el 26S de *S.cerevisiae*, *K. marxianus* y *T. delbrueckii* son de 570, 533 y 584 pb, respectivamente, y los tamaños esperados para el ITS son 711, 678 y 674 pb, respectivamente.

Cuadro 19. Detección de las especies *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *T. delbrueckii* en medio de mosto mediante la técnica ARISA, inóculo en mezcla 0.1:1:1.

Tiempo	26S						ITS					
	Tamaño obtenido en ABI (pb)			Unidades relativas de fluorescencia (RFU's)			Tamaño obtenido en ABI (pb)			Unidades relativas de fluorescencia (RFU's)		
	Sc	Km	Td	Sc	Km	Td	Sc	Km	Td	Sc	Km	Td
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	0	546	583	0	1146	7857	711	677		4407	454	0
60	566	546	584	1067	7756	475	710	691	658	3729	423	756
84	570	544	585	1923	3877	2612	709	677	0	5282	611	0
120	570	558	584	2157	120	7998	710	0	0	4642	0	0

El tamaño esperado de los fragmentos, de acuerdo a las determinaciones por secuenciación, para el 26S de *S.cerevisiae*, *K. marxianus* y *T. delbrueckii* son de 570, 533 y 584 pb, respectivamente, y los tamaños esperados para el ITS son 711, 678 y 674 pb, respectivamente.

Cuadro 20. Detección de las especies *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *T. delbrueckii* en medio de mosto mediante la técnica ARISA de manera individual

Tiempo	<i>S. cerevisiae</i>				<i>K. marxianus</i>				<i>T. delbrueckii</i>			
	Tamaño obtenido (pb)		Unidades relativas de fluorescencia (RFU's)		Tamaño obtenido (pb)		Unidades relativas de fluorescencia (RFU's)		Tamaño obtenido (pb)		Unidades relativas de fluorescencia (RFU's)	
	26S	ITS	26S	ITS	26S	ITS	26S	ITS	26S	ITS	26S	ITS
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	579	710	1347	1364	550	676	1652	3671	583	670	3631	3215
60	575	712	1512	2471	547	680	2274	2013	582	668	5463	2418
84	574	712	2625	2909	549	676	1695	4954	584	672	1224	897
120	579	711	7357	4131	549	677	1998	1543	583	670	4340	983

El tamaño esperado de los fragmentos, de acuerdo a las determinaciones por secuenciación, para el 26S de *S.cerevisiae*, *K. marxianus* y *T. delbrueckii* son de 570, 533 y 584 pb, respectivamente, y los tamaños esperados para el ITS son 711, 678 y 674 pb, respectivamente.

VIII. DISCUSIÓN

El mezcal es una bebida alcohólica artesanal mexicana, cuya elaboración se extiende en varios estados de la república mexicana incluyendo Tamaulipas. Existen muy pocos estudios a nivel microbiológico acerca del proceso de fermentación y elaboración de esta bebida, por lo que es necesario conocer más a fondo este proceso, y no solamente durante la fermentación sino abarcando otras etapas del proceso como son la molienda, el cocido de las piñas y la destilación; no obstante cabe resaltar que es durante la fermentación que ocurren los procesos biológicos que proporcionan aquellas características organolépticas que en gran medida originan la calidad final del producto. En este trabajo se obtuvieron importantes avances en el conocimiento de la dinámica poblacional del proceso de elaboración del mezcal de Tamaulipas, dando seguimiento a la presencia de las tres levaduras más importantes en la fermentación del mezcal de manera molecular haciendo uso de dos técnicas de análisis genómico global.

Desde el punto de vista microbiológico tradicional, y comparando con lo que sucede en el sistema de fermentación vinícola, es la bebida fermentada más estudiada, se ha observado que la concentración inicial de células usualmente es de $10^4 - 10^5$ cel mL⁻¹ para las especies no-*Saccharomyces* y de 10^2-10^3 cel mL⁻¹ para las *Saccharomyces*, sin embargo conforme transcurre el proceso de fermentación, las no-*Saccharomyces* desaparecen y las especies de *Saccharomyces* aumentan alcanzando alrededor de 10^7-10^8 cfu mL⁻¹ al llegar a la etapa final del proceso (Xufre *et al.*, 2006). Haciendo una analogía con lo que sucede en mostos de uva para el caso de mostos de *Agave* spp, en este trabajo la concentración celular fue establecida a un inóculo inicial de 1×10^4 cel mL⁻¹ en la fermentación realizada en medio sintético y medio de mosto, es importante desde el punto de vista del proceso hacer una relación similar a la que se presenta en el sistema de fermentación vinícola y con ello verificar si la concentración celular de una especie en particular tienen impacto en las características organolépticas del producto final. En las siguientes secciones se discuten los hallazgos obtenidos en este trabajo, que se han dividido por el tipo de medio de fermentación utilizado, esto es, medio sintético ó medio de mosto.

VIII.1. Cinética de la fermentación en medio sintético

El seguimiento de la cinética presentada durante la fermentación en medio sintético mostró el comportamiento típico de utilización de azúcares en dos etapas, debido a la presencia de glucosa y fructosa en los medios. También se observó que la producción de etanol, así como de glicerol en general fue más baja al utilizar un inóculo menor de la levadura de la especie *S. cerevisiae*, ya que los valores máximos de etanol alcanzados fueron del orden de 41 g L^{-1} . Se ha reportado evidencia de que esta levadura, en particular a altas concentraciones de azúcar, muestra mayor eficiencia durante la fermentación y con ello una alta producción de etanol alcanzando valores cercanos a los 50 g L^{-1} (Arrizon *et al.*, 2002), valor que es casi alcanzado en la fermentación llevada a cabo con el inóculo de $1 \times 10^4 \text{ cel mL}^{-1}$ de cada una de las levaduras analizadas en este estudio.

En el caso del glicerol, el otro metabolito analizado, que en la fermentación elaborada con el inóculo inicial 1:1:1 los valores son menores alcanzando niveles de alrededor de 6 g L^{-1} mientras que en el caso de la fermentación inoculada con una décima parte de *S. cerevisiae* se obtuvo una producción mayor, de 8 g L^{-1} . Dicho comportamiento se explica por la influencia de la alta concentración inicial de azúcar en el medio (De León *et al.*, 2008), y dado que *S. cerevisiae* asimila de manera más rápida los azúcares presentes (glucosa y fructosa), produciendo así una mayor cantidad de etanol y menor cantidad de biomasa, por tanto, la cantidad de sustrato disponible para la producción de glicerol es menor. Es por ello que en la fermentación con el inóculo menor de esta especie son *K. marxianus* y *T. delbrueckii* quienes dan inicio de la fermentación presentando una asimilación más lenta del sustrato el cual, es destinado a la producción de glicerol como manera de protección contra las altas concentraciones de etanol que comienzan a incrementarse y presentarse en el medio una vez que *S. cerevisiae* inicia su crecimiento. Los rendimientos de etanol con respecto a los azúcares consumidos de los dos inóculos en medio sintético fueron altos (alrededor de 0.43 g g^{-1}) el cual es cercano al máximo teórico (0.51 g g^{-1}), aunque la fermentación fue incompleta ya que hubo en ambos casos fructosa residual en el medio.

VIII.1.1. Seguimiento de la dinámica poblacional durante la fermentación en medio sintético

En las fermentaciones analizadas en medio sintético, en ambos inóculos de las levaduras empleadas, se observó que *Sacharomyces cerevisiae* predomina en la etapa inicial de fermentación, además de que su presencia se mantiene y predomina en la etapa final, a diferencia de *Kluyveromyces marxianus* y *Torulaspora delbrueckii*, las cuales mantienen un crecimiento similar al inicio de la fermentación, sin embargo conforme transcurre el proceso de la fermentación su concentración (área) se estabiliza y predomina la especie *S. cerevisiae*, y de esta manera gobierna la etapa final, lo que se presenta generalmente cuando se alcanza una concentración mayor al 12-15% (Fleet, 2003) aunque las concentraciones máximas alcanzadas de etanol en este medio nunca rebasaron los 50 g L⁻¹ y en teoría las tres especies son capaces de soportar esta concentración.

VIII.2. Cinética de la fermentación en el medio de mosto

En la caracterización productiva obtenida durante la fermentación en medio de mosto, solamente fue posible corroborar las producciones de etanol y de biomasa, ya que el glicerol, como fue comentado en la sección de resultados, no pudo ser determinado por HPLC (apéndice 8). Las cinéticas fueron similares para ambos inóculos utilizados, con una producción de etanol menor que la observada en el medio sintético, y también siendo menor que lo reportado en otro medio de mosto por Arratia Mireles (2010). Esto pudiera deberse a la influencia de la composición del lote de mosto específico que fue utilizado en este trabajo para preparar el medio de mosto, ya que su obtención no está estandarizada por los productores de mezcal. Sin embargo, entre ellas siguen manteniendo su producción relativa, donde *S. cerevisiae* 3Y5 y *T. delbrueckii* 1D2 son mejores productoras de etanol a las 60 horas que *K. marxianus* 4D2.

Adicionalmente, y considerando que las 3 especies de levaduras presentan un buen crecimiento individual en el medio de mosto y una producción similar de etanol, el que predomine *S. cerevisiae* al final de la fermentación pudiera ser relacionado con una posible

actividad zimocida (*killer*), es decir que producen compuestos tóxicos para otras levaduras, lo cual podría ser una explicación de por qué las otras levaduras presentes en las primeras etapas de la fermentación desaparezcan conforme transcurre este proceso, aún cuando las concentraciones de etanol son relativamente bajas y los mostos de *Agave* spp pueden llegar a alcanzar concentraciones del doble del valor máximo (Díaz-Montaño *et al.*, 2008) del aquí observado.

VIII.2.1. Seguimiento de la dinámica poblacional durante la fermentación en medio de mosto

En las fermentaciones analizadas en medio de mosto, en ambos inóculos, se observa que la levadura *Sacharomyces cerevisiae* predomina después de 24 horas la fermentación. Se sabe que en la fermentación espontánea de bebidas obtenidas de *Agave* spp es en las primeras etapas donde se encuentra la mayor diversidad de especies de levaduras y es también donde se producen aquellos aromas específicos y únicos de esta bebida, lo cual es realizado por levaduras del género no-*Saccharomyces*, mismas que llegan a producir altas concentraciones de ciertos compuestos volátiles como algunos ácidos que proporcionan y suelen determinar la calidad sensorial de dichas bebidas alcohólicas. Las especies de levaduras involucradas en la fermentación de mostos de agave son variables y no hay un solo tipo de mezcal que tenga el mismo perfil poblacional, Por ejemplo, en mostos de *Agave salmiana* (mezcal potosino) se identificaron 4 especies de levaduras involucradas en el proceso: *C. lusitaniae*, *K. marxianus*, *P. fermentans* y *S. cerevisiae*, y en caso de mostos de *Agave duranguensis* (mezcal duranguense) se identificaron dos especies de levaduras involucradas en el proceso: *S. cerevisiae* y *K. marxianus* (Lappe *et al.*, 2008). En el caso del mezcal de Michoacán se aislaron *Candida magnoliae*, *Hanseniospora vineae*, *H. uvarum*, *Issatchenkia occidentalis*, *Kluyveromyces lactis*, y *Saccharomyces cerevisiae* en 13 diferentes destilerías (Gschaedler Mathis *et al.*, 2004). En el caso del mezcal de Oaxaca, encontraron a *Candida* spp., *Hanseniaspora* spp. y *S. cerevisiae* (Andrade Meneses y Ruiz Teran (2004), citado en Lappe-Oliveras *et al.*, (2008); en tanto que del mosto de *A. fourcroydes* de mezcal de Yucatán, se aislaron especies de *Candida* spp, *C. parasilopsis*, *C. lusitaniae*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia caribbica*, *P.*

guilliermondii, *Rhodotorula* spp., *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* en una fermentación natural (Lappe-Oliveras *et al.*, 2008). Sin embargo, en todos los trabajos anteriores, no se realiza la caracterización productiva ni la dinámica de poblaciones en esos sistemas, principalmente debido a la complejidad de estas fermentaciones de inóculo mixto y espontáneo. Es claro que existe una gran diversidad y diferencias en la dinámica poblacional de las levaduras que se encuentran presentes durante la fermentación del mezcal producido en los diferentes estados de México, las cuales influyen la calidad de esta bebida artesanal. La presencia de diferentes levaduras así como el la variedad de *Agave* spp específicos para cada uno de los productos regionales confieren propiedades organolépticas únicas y específicas, que requieren sean estudiadas de manera individual.

VIII.3. Identificación molecular de levaduras en la fermentación mediante la técnica de ARISA

El uso de la técnica ARISA permitió obtener electroferogramas diferenciales para cada una de las levaduras analizadas, y observándose variaciones de un par de bases en el tamaño de cada uno de los picos arrojados por el ABI Prism de las especies involucradas en este estudio las cuales fueron *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *T. delbrueckii*. Las observaciones revelaron que en la mayoría de los casos es muy difícil ligar el tamaño de algún pico en particular a una especie (Fisher *et al.*, 1999, Knief *et al.*, 2008). De manera relevante, las levaduras utilizadas presentan un patrón diferencial de sus productos ITS y 26S que pueden ser utilizados para su seguimiento puntual, y el paso limitante del proceso fue debido al proceso de extracción e integridad del ADN de las muestras del mosto de agave, sin embargo, después de 48 horas, una vez que la acumulación de células eran las suficientes para tener ADN amplificable o cuando el factor inhibitorio había disminuído de concentración, la amplificación se llevó a cabo sin ningún problema, cabe mencionar que para el uso de dicha técnica son preferibles fragmentos de PCR pequeños debido a que el tamaño es mas preciso al momento de su determinacion (Knief *et al.*, 2008). Sin embargo, para que esta técnica sea utilizada de manera rutinaria en el seguimiento de cultivos mixtos

requiere aún de optimización y estandarización, y los resultados obtenidos en este trabajo constituyen la primera etapa de ese proceso.

La técnica ARISA mostro ser rápida, reproducible y específica para la evaluación de las especies de levaduras aquí utilizadas. Sin embargo la estimación de la abundancia de las levaduras presentes la interpretamos con cierta cautela debido a los posibles sesgos introducidos por el número de ciclos de amplificaciones y concentración de ADN utilizado para la previa amplificación (Popa *et al.*, 2009), puesto que este tipo de sesgo introducido de manera no deseada genera patrones de electroferogramas con picos como falsos positivos mostrando bajas unidades relativas de fluorescencia así como tamaños pequeños que también pueden ser atribuidos a restos del oligonucleótido empleado así como a la fragmentación que el producto puede sufrir durante la desnaturalización con formamida. No obstante es de tomarse en cuenta el estándar utilizado en el análisis, puesto que pueden presentar una diferencia entre los tamaños de los fragmentos resueltos mediante el uso de esta técnica y aquellos dados por la secuenciación presentándose una discrepancia entre los fragmentos de 1 a 13 pb, pudiendo presentar una diferencia de tamaño mayor cuanto mayor sea el fragmento analizado (Fisher *et al.*, 1999).

Se logró distinguir entre las especies de levaduras utilizadas en el estudio en ambos medios empleados para la fermentación llevada a cabo, con ello la determinación de la asociación de la comunidad de estas levaduras en dichos sustratos respaldado por la previa amplificación de cada una de ellas. Este análisis muestra que es posible hacer una asociación específica de las comunidades fúngicas o bacterianas presentes en un sustrato en particular usado durante la fermentación alcohólica. Es posible atribuir las diferencias en la composición de la comunidad a las características específicas de cada una de las plantas hospedantes incluyendo la fisiología, anatomía, madurez, y química de la pared celular (Torzilli *et al.*, 2006, Mougél *et al.*, 2006) así como a la interacción entre los metabolitos excretados por cada una.

Al observar las unidades de fluorescencia y hacer una comparación con el tiempo de la toma de muestra se aprecia un modelo similar al de crecimiento celular, no obstante podemos ver también que al transcurrir el tiempo los RFU's cambian para cada una de las

especies presentes. Estas unidades relativas de fluorescencia proporcionan un acercamiento a la abundancia relativa de los distintos fragmentos obtenidos, esto basado en que la abundancia suele ser más reproducible para aquellos picos que contribuyen a una mayor cantidad de fluorescencia (Fisher *et al.*, 1999). Curiosamente los valores de las unidades de fluorescencia pueden no presentar algún cambio proporcional aun teniendo algún factor de dilución, reflejando el hecho de que la concentración de cada secuencia u organismo presente fue inicialmente desconocida. En efecto los valores de fluorescencia deberán ser obtenidos mediante una estandarización de las áreas máximas individuales por muestra para con ello hacer posible una relación entre las unidades de fluorescencia y la abundancia de los organismos presentes en la muestra (Ramette *et al.*, 2009). Dicho comportamiento puede ser debido a que sigue la trayectoria normal de la fermentación es decir conforme avanza el tiempo incrementa la concentración de etanol, cambio de pH, de temperatura, viabilidad de sustrato pero mayor mente interacciones microorganismo-microorganismo (Hansgate *et al.*, 2005, Mougél *et al.*, 2006) dando como resultado por estos factores un estrés a aquellas levaduras que no toleran las altas concentraciones de etanol o cambios en el medio de fermentación, mostrando con ello los cambios que se pueden presentar durante este proceso y aunque en primera instancia es difícil discernir la población que se encontró, si es muestra con inóculo desconocido, los cambios en la dinámica son evidentes. Por lo tanto podemos sugerir que aquella señal de mayor intensidad al final del proceso fermentativo puede ser la especie representativa o gobernante de la comunidad presente en el medio, puesto que cuando el número de secuencias presentes en una mezcla de ADN es mayor, como en muestras ambientales, los picos pequeños pueden ser discriminados debido a la presencia de los picos más altos y dominantes, debido a que esta diferencia en magnitud revela la probabilidad de corresponder a artefactos de la PCR (Ramette *et al.*, 2009).

El no observar pico alguno en alguna de las regiones de las tres especies de levaduras representativas analizadas en este estudio demuestra y respalda que la colonización en el estadio de la fermentación no es particular para alguna especie en particular (Knief *et al.*, 2008), si no que se lleva a cabo una dinámica poblacional que puede o no mostrar aquellos organismos que están o estuvieron presentes en el medio estudiado.

VIII.4. Seguimiento de la dinámica poblacional de las levaduras durante la fermentación mediante la técnica de FISH

Las sondas usadas en la técnica FISH mostraron una señal de fluorescencia única y específicamente con especie para la cual fueron diseñadas, así como la sonda universal EUK que mostro una señal en todas y cada una de las muestras analizadas confirmando con ello buenas condiciones de la permeabilidad de la célula (Xufre *et al.*, 2006). Se detectó una débil fluorescencia de fondo en la cepa de *T. delbrueckii* aunque no comparable con la señal emitida por hibridación de la sonda de *S. cerevisiae* y *K. marxianus* puesto que mostraban una señal fuerte y clara de la célula, descartando así la posible autofluorescencia que se ha reportado para otras levaduras (Xufre *et al.*, 2006). Para las sondas reportadas y utilizadas así como las diseñadas fueron sometidas a diferentes condiciones de hibridación. Sin embargo, el uso de las condiciones de la hibridación con diferentes rangos astringentes, como la concentración de formamida, no mejoro significativamente la intensidad de fluorescencia (Apéndice 1) esto de acuerdo a estudios previos por otros autores (Inácio *et al.*, 2003). La técnica FISH demostró entonces tener una alta especificidad y ser de un gran potencial para su implementación rutinaria en el seguimiento de la dinámica poblacional de fermentaciones con inóculos mixtos, y tal y como ha sido reportado en el caso del vino, a diferencia de otros métodos de identificación morfológica, este provee un 99.99% de identificación definitiva independientemente de la experiencia y habilidad del técnico que procesa la muestra (Stender *et al.*, 2001). Es posible que algunas especies de menor importancia fueron pasadas por alto en este estudio, ello debido al difícil diseño de sondas especie específicas, sin embargo dichas levaduras seleccionadas representan un 6% del total de las colonias aisladas y cerca del 33% de las especies encontradas en el trabajo que precede a nuestro estudio (Arratia Mireles, 2010) considerando que la selección realizada cubrió las diferencias macro-morfológicas y aseguró que las especies predominantes fueran cubiertas en el análisis.

La técnica FISH arrojó una estimación de valores muy similares para el caso de ambos medios de fermentación utilizados en este estudio, teniendo así 5×10^3 cel mL⁻¹ para el caso de *S. cerevisiae* y de 3×10^3 cel mL⁻¹ para las otras 2 especies, valores similares a los obtenidos por Xufre *et al.* (2006) en el estudio realizado en vino tinto (5.3×10^3 cel mL⁻¹

para *S. cerevisiae* y 5.7×10^3 cel mL⁻¹ para las no-*Saccharomyces*) y vino blanco (5.6×10^4 cel mL⁻¹ para *S. cerevisiae* y 3.7×10^4 cel mL⁻¹ para las no-*Saccharomyces*), obteniéndose entonces que la concentración celular obtenida presenta valores similares a aquellos reportados en fermentaciones realizadas en mostos de uva, seguramente debido a que se utiliza concentraciones de azúcares iniciales similares en los mostos.

Los resultados mostraron que la cuantificación por el método de FISH combinado con el recuento en placa confirman el número de las cuentas en una fermentación de vino tradicional, esto informado anteriormente por otros autores (Fleet *et al.*, 1984) independientemente de que las especies de levaduras presentes y sus progresiones relativas no sean totalmente coincidentes. La cuantificación de las diferentes especies de levaduras durante el proceso de fermentación de cada uno de los medios empleados mostró que *S. cerevisiae* es la población principal a partir de las 24 horas del proceso fermentativo. Después de esta hora observamos que las otras dos especies fueron, aunque en bajas concentraciones, capaces de persistir hasta el final de la fermentación. Por otra parte, tanto en la fermentación en medio de mosto como en medio sintético las levaduras de la especie *K. marxianus* y *T. delbrueckii*, que predominaron en la primera etapa de la fermentación fueron aquellas que al incrementar el tiempo así como la concentración de etanol en el medio comenzaron a declinar y permanecer en niveles bajos en el medio de la fermentación, siendo estos resultados concordantes con los reportados por algunos autores (Cocolin *et al.*, 2000). La importancia potencial que muestran las levaduras nativas para el proceso de vinificación y la calidad sensorial de los vinos han interesado a diferentes autores para poder comprender la complejidad de las interacciones que dan el aroma específico al vino. (Fleet *et al.*, 2003). Los resultados aquí presentados, basados en la identificación precisa de las levaduras utilizadas con sondas especie específicas de FISH presentes en el medio de fermentación, muestran claramente que las especies analizadas definitivamente deben tener una importante participación en la calidad final de la bebida alcohólica. Hasta donde se tiene conocimiento, este tema está escasamente investigado. El potencial de la técnica de FISH para la identificación de levaduras directamente de los mostos fermentados es enorme, pero requiere todavía una gran inversión de tiempo en poner a punto las sondas específicas para el resto de las especies presentes en los mostos de agave.

IX. CONCLUSIONES

La técnica FISH permitió analizar de manera cuantitativa la diversidad poblacional de las levaduras más productivas durante la fermentación en dos tipos de medios, describiendo la evolución poblacional de las levaduras y mostrando que es en un inicio donde se presenta la diversidad pues encontramos a *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *T. delbrueckii*, las cuales se presentan en proporciones distintas y significantes durante el transcurso del proceso fermentativo. Sin embargo, son las células de la especie *S. cerevisiae* las cuales predominan en la etapa final de la fermentación. Las fermentaciones inoculadas con una mezcla de las levaduras produjeron concentraciones de etanol similares a lo reportado por la literatura además de la producción de otros metabolitos que suelen influir considerablemente en las características organolépticas del producto final.

El uso de la técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) demostró ser un método poderoso para el seguimiento de las tres levaduras empleadas en este estudio, siendo una de las aportaciones más importantes de este trabajo el haber logrado realizar el seguimiento de la dinámica poblacional a lo largo de la fermentación, y optimizando para un medio complejo (medio de mosto) que contiene sustancias fenólicas y una turbidez tal que dificultan cualquier otra técnica de microscopía que utilice el espectro visible de luz para el análisis.

Mediante el uso de la técnica ARISA se logró analizar la diversidad poblacional de las levaduras más productivas durante la fermentación en dos tipos de medios, mostrando que desde el inicio de la fermentación encontramos a *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *T. delbrueckii* en cantidades mínimas pero significantes, puesto que son suficiente para la amplificación y su posterior detección en el electroferograma específico, al menos en el medio simple sintético, durante el transcurso del proceso fermentativo. Sin embargo, cabe resaltar que el análisis realizado en dicho proceso es cualitativo, de ausencia-presencia, y sin embargo este es el primer estudio reportado en levaduras con dicha técnica, puesto que los reportes encontrados en la literatura son con bacterias.

En los últimos años han aparecido técnicas moleculares novedosas para el estudio y seguimiento de los microorganismos utilizados en la industria de las fermentaciones que han permitido identificar una gran diversidad de especies de interés económico e industrial. Las técnicas ARISA y FISH mostraron un gran poder de resolución e identificación para los aislamientos probados en este estudio, por lo que es recomendable utilizarlas como una caracterización de las levaduras y, con sondas específicas, también para bacterias presentes en los mostos para hacer una separación e identificación rápida de las diferentes especies que puedan estar presentes en los mostos de mezcal.

X. RECOMENDACIONES

El mezcal, por ser una bebida artesanal, requiere de un estudio más profundo acerca de las diferentes especies de levaduras así como de los otros microorganismos que se encuentran presentes durante cada una de las etapas de fermentación, ya que si bien en el presente estudio han sido analizadas las tres especies de levaduras de mayor predominancia numérica, es necesario analizar el conjunto de todas las especies de levaduras que se pueden presentar en este proceso, además de que se debería considerar en una etapa posterior a las bacterias que de igual manera pudiesen coadyuvar al proceso fermentativo.

Es recomendable estudiar por cromatografía de gases los otros metabolitos secundarios que se sabe están presentes en los mostos de mezcal, tales como ésteres y ácidos orgánicos que son producidos tanto por levaduras como por bacterias, por ejemplo los ácidos acético, láctico, succínico, málico y cítrico, así como también es necesario estudiar los alcoholes superiores que pueden presentarse en las etapas iniciales de la fermentación, los cuales se sabe se generan a partir de los restos vegetales y que tienen un fuerte impacto en las características organolépticas del producto final.

Existen otras técnicas moleculares con las cuales se puede monitorear a las levaduras del mezcal tales como la caracterización molecular global mediante el análisis de regiones ribosomales conocida también como q-ARISA, con la cual se podría hacer el seguimiento de las especies y de la dinámica poblacional, y en conjunto aplicar la técnica de FISH con un mayor alcance, empleando un mayor número de sondas especie-específicas para con ello lograr estandarizar la implementación de las técnicas para una caracterización microbiológica de los mostos en una cantidad de tiempo mucho menor a la utilizada por los métodos tradicionales, puesto que el potencial para la identificación y seguimiento poblacional de las levaduras analizadas de las técnicas empleadas en este estudio es evidente por los resultados aquí presentados.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Arratia Mireles J.M. (2010). Diversidad genética de levaduras involucradas en la fermentación del mezcal Tamaulipeco. Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología. Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional. Reynosa. Tamaulipas, México. 103 p.
- Arrizon J., Gschaedler A. (2002). Increasing fermentation efficiency at high sugar concentrations by supplementing an additional source of nitrogen during the exponential phase of the tequila fermentation process. *Can. J. Microbiol.* 48: 965-970.
- Arrizon J., Fiore C., Acosta G., Romano P., Gschaedler A. (2005). Fermentation behaviour and volatile compound production by *agave* and grape must yeasts in high sugar *Agave tequilana* and grape must fermentations. *Antonie van Leeuwenhoek* 89 (1): 181-189.
- Baleiras Couto M.M., Reizinho R.G., Duarte F.L. (2005). Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterise non-*Saccharomyces* yeast present during red wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 102: 49-56.
- Biosca J.A., Fernandez M. R., Larroy Ca., González E.P.X. (2002). Descripción y funciones metabólicas de las alcohol deshidrogenasas de *Saccharomyces cerevisiae*. Algunos aspectos de ingeniería metabólica aplicados a la fabricación de la cerveza. *Cerveza y malta XXXIV* 195(3): 27-38.
- Blomberg L. (2001). Tequila, Mezcal y Pulque. Editorial Diana, México. Pp. 243 y 244
- Capece A., Salzano G., Romano P. (2003). Molecular typing techniques as a tool to differentiate non-*Saccharomyces* wine species. *International Journal of Food Microbiology* 84: 33-39.
- Cocolin L., Bisson L.F, Mills, D.A. (2000). Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiolgy Letters* 189: 81-87.

- De Barros Lopes M., Rainieri S., Henschke P.A., Langridge P. (1999). AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49: 915-924.
- De León Rodríguez A., Escalante Minakata P., Barba de la Rosa A.P. Blaschek H. P. (2008). Optimization of fermentation conditions for the production of the mezcal from *Agave salmiana* using response surface methodology. *Chemical Engineering and Processing* 47: 76–82.
- Díaz-Montaño D.M., Marie D., Estarrón M., Strehaiano P. (2008). Fermentative capability and aroma compound production by yeast strains isolated from *Agave tequilana* Weber juice. *Enzyme and Microbial Technology* 42: 608–616
- Erasmus D.J., van der Merwe G. K., van Vuuren H. J.J. (2003). Genome-wide expression analyses: Metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. *FEMS Yeast Research*: 375-399.
- Escalante- Minakata P., Ibarra-Junquera V., González-García R., De Leon Rodriguez A. y Rosu HC (2008). An algorithm for real-time estimation of Mezcal fermentation parameters based on redox potential measurements. *Quantitative Biology*, 1-13.
- Escalante-Minakata P., Blaschek H.P., Barba de la Rosa A.P.Santos L, De Leon-Rodriguez A. (2008). Identification of yeast and bacteria involved in the mezcal fermentation of *Agave salmiana*. *Letters in Applied Microbiology* 48: 626-630.
- Fisher M.M., Triplett E.W. (1999). Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its applications to freshwater bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 65(10): 4630-4636.
- Fleet G.H., Lafon Lafourcade S., Ribereau Gayon P. (1984). Evolution of yeast and lactic acid bacteria during fermentation and storage of bordeaux wines. *Applied and Environmental Microbiology* 48(5): 1034-1038.
- Fleet G.H. (2003). Yeast interactions and wine flavor. *International Journal of Food Microbiology* 86: 11-22.

- Flores Berrios E.P., Alba González J.F., Arrizon Gaviño J.P., Romano P., Capece A. Gschaedler Mathis A. (2005). The uses of AFLP for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity between yeast isolated from Mexican agave-distilled beverages and from grape musts. *Letters in Applied Microbiology* 41: 147-152.
- Guerra J.B., Araujo R.A.C., Pataro C., Franco G.R., Moreira E.S.A., Mendonca Hagler L.C., Rosa C.A. (2001). Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. *Letters in Applied Microbiology*, 106-111.
- Gschaedler Mathis A., Ramírez Cordova J., Diaz Montaña D., Herrera López H., Arellano Plaza M., Arrizon Gaviño J., Pinal Zuazo L. (2004). Fermentación: etapa clave en la elaboración del tequila. En: *Ciencia y Tecnología del Tequila, Avances y Perspectivas*, Ed. Centro de Investigación y Asistencia Tecnológica y Diseño del Estado de Jalisco, Guadalajara, México. pp. 32–120.
- Hazelwood L. A., Daran J.M., van Maris A.J. A., Pronk J.T. Dickinson R. (2008). The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (8): 259-2266.
- Hansgate A.M., Schloss P.D., Hay A.G., Walker L.P. (2005). Molecular characterization of fungal community dynamics in the initial stages of composting. *FEMS Microbiology Ecology* 51: 209-214.
- Hernández Mota E.G. (2010). Análisis metagenómico y fisicoquímico de mostos de mezcal Tamaulipeco. Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología. Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional. Reynosa. Tamaulipas, México. 68p.
- Ibarra-Junquera V., Escalante-Minakata P., Murguía J.S., Rosu H.C. (2006). Inferring mixed-culture growth from total biomass data in a wavelet approach. *Physica A* 370: 777-792.

- Inácio J., Behrens S., Fuchs B.M., Fonseca A., Martins I.S., Amman R. (2003). *In situ* accessibility of *Saccharomyces cerevisiae* 26S rRNA to Cy3-labeled oligonucleotide probes comprising the D1 and D2 domains. *Applied and Environmental Microbiology* 69(5): 2899-2905.
- Jacques C., López A.I., Anaya C.L., Sifuentes A.M., Taillandier P., Ramón F. (2006). Identificación (ID) de levaduras aisladas de mostos de mezcal: ID morfológica-bioquímica (M-B) vs molecular (Mol). *En: Chanona J., Ordorica C., Mulet A., Alamilla L., Sosa M.E., Parada E., Welti J., Gutiérrez G. Editores. "Hacia una visión integrada de la ingeniería de alimentos". Extenso del V Congreso Ibero-Americano de Ingeniería de Alimentos. México, D.F. Pp 1-6.*
- Jones S. E., Shade A. L., McMahon K. D., Kent A. D. (2007). Comparison of Primer Sets for Use in Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Aquatic Bacterial Communities: an Ecological Perspective. *Applied and Environmental Microbiology* 73(2): 659-662.
- Knief C., Frances L., Cantet F., Vorholt J.A. (2008). Cultivation-independent characterization of *Methylobacterium* population in the plant phyllosphere by automated ribosomal intergenic spacer analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 74(7): 2218-2228.
- Lappe-Oliveras P., Moreno-Terrazas R., Arrizón-Gaviño J., Herrera-Suárez T., García-Mendoza A., Gschaedler-Mathis A. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled *Agave* beverages. *FEMS Yeast Research* 8: 1037-1052.
- Lopes C.A., van Broock M., Querol A., Caballero A.C. (2002). *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast populations in a cold region in Argentinean Patagonia. A study at different fermentation scales. *Journal of Applied Microbiology* 83: 608-615.
- Mesas J. M., Alegre M. T. (1999). The role of the microorganism in winemaking, *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 2(4): 174-183.

- Montrocher R., Verner M. C., Gautier C., Marmeisse R. (1998). Phylogenetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* group based on polymorphisms of rDNA spacer sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 295-303.
- Morales Carrillo N., Escobar Moreno D.A., Paredes Hernández E. (2007). Estudio sobre el impacto que las modificaciones a la NOM-070 traerán a la industria del mezcal. Universidad Autónoma de Chapingo- CRUCEN, Centro Regional Universitario Centro Norte.
- Mougel C., Offre P., Ranjard L., Corberand T., Gamalero E., Robin C., Lemanceau P. (2006). Dynamic of the genetic structure of bacterial and fungal communities at different developmental stages of *Medicago truncatula* Gaertn. cv. Jemalong line J5. *New Phytologist* 170: 165-175.
- Nadal D., Colomer B., Piña B. (1996). Molecular polymorphism distribution in phenotypically distinct populations of wine yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology* 62(6): 1944-1950.
- Narváez -Zapata J.A., Rojas- Herrera R.A., Rodriguez-Luna I.C., Larralde-Corona C.P. (2010). Culture-independent analysis of lactic acid bacteria diversity associated with mezcal fermentation. *Current Microbiology* 61(5): 444-450.
- Navarrete-Bolaños J.L., Serrato-Joya O., Botello-Alvarez E., Jimenez-Islas H., Cardenas-Manriquez M., Conde-Barajas E., Rico-Martínez R. (2007). Analyzing microbial consortia for biotechnological processes design. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology* 1: 437-449.
- Ostergaard S., Olsson L., Nielsen J. (2000). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology* 64(1): 34-50.
- Pina C., Gonçalves P., Prista C., Loureiro-Dias M.C. (2004). Ffz1, a new transporter specific for fructose from *Zygosaccharomyces bailii*. *Microbiology* 150: 2429-2433.

- Perpete P. (2001). Amplified fragment-length polymorphism, a new method for the analysis of brewer's yeast DNA polymorphism. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 59(4): 195-200.
- Popa R., Popa R., Mashall M.J., Nguyen H., Tebo B.M, Brauer S. (2009). Limitations and benefits of ARISA intra-genomic diversity fingerprinting. *Journal of Microbiological Methods* 78: 111–118.
- Ramette A. (2009). Quantitative community fingerprinting methods for estimating the abundance of operational taxonomic units in natural. *Applied and Environmental Microbiology* 75(8): 2495-2505.
- Reader, U., Broda, P. (1985) Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters Applied Microbiology* 1: 17-20.
- Rojas, H.R, Narvaez, Z.J, Zamudio, M.M, Mena, M.M.E. (2008). A simple silica-based method for metagenomic DNA extraction from soil and sediments. *Molecular Biotechnology* 40: 13-17.
- Salgueiro Sancha P., Sa-Correia I., Novais J.M. (1988). Ethanol-Induced leakage in *Saccharomyces cerevisiae*: kinetics and relationship to yeast ethanol tolerance and alcohol fermentation productivity. *Applied and Environmental Microbiology* 54(4): 903-909.
- Sánchez N.S., Calahorra M., González J.C., Peña A. (2005). Secuencia glucolítica y metabolismo respiratorio en *Debaryomyces hansenii* comparada con *Saccharomyces cerevisiae*. Memorias del XIV congreso de Bioenergética y Biomembranas. Oaxaca; Oaxaca.
- Simpson, Joyce M. Kocherginskaya, Svetlana A. Aminov, Roustam I. Skerlos, Laura T. Bradley, Terence M. Mackie, Roderick I. White Bryan A. (2002). Comparative microbial diversity in the gastrointestinal tracts of food animal specie. *Integrative and Comparative Biology*, 327-331.

- Sujaya I. N., Antara N.S., Sone T., Tamura Y., Aryanta W.R., Yokota A., Asano K., Tomita F. (2004) Identification and characterization of yeasts in *brem*, a traditional Balinese rice wine. *Journal of Microbiology* 20(2): 143-150.
- Stender H., Kurtzman C., Hyldig-Nielsen J.J., Sorensen D., Broomer A., Oliveira K., Perry-O'keefe H., Sage A., Young B., Coull J. (2001). Identification of *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*) from wine by fluorescence *in situ* hybridization using peptide nucleic acid probes. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (2): 938-941.
- Torzilli A.P., Sikaroodi M., Chalkley D., Gillevet P.M. (2006). A comparison of fungal communities from four salt marsh plants using automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA). *Mycologia* 98: 690-698.
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White (Eds.), Academic Press, London UK. pp. 315–322.
- Xufre A., Albergaria H., Inácio J., Spencer-Martins I., Girio F. (2006). Application of fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) to the analysis of the yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 108: 376-384.
- Zagorc T., Maraz A., Cadez N., Povhe J. K., Péter G, Resnik M., Nemanicí J., Raspor P. (2001). Indigenous wine killer yeasts and their application as a starter culture in wine fermentation. *Food Microbiology* 18: 441-451.

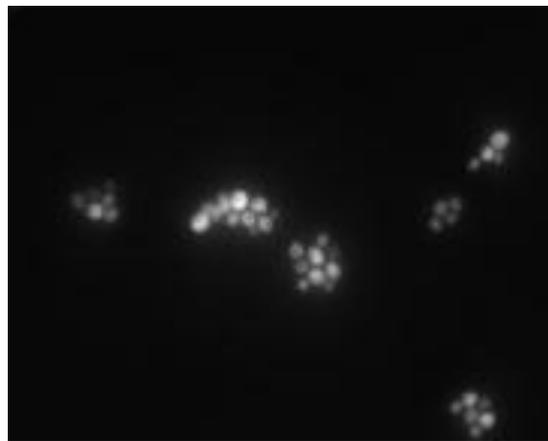
APÉNDICES

Apéndice 1 Imágenes de las levaduras utilizadas en este estudio del tratamiento con formamida.

Tratamiento al 35%, objetivo 100X.



Levaduras observadas con DAPI



Levaduras observadas con la sonda EUK



Levadura Sc 3Y5 con la sonda ScP



Levadura Sc 3Y5 con la sonda ScX



Levadura Td 1D2 con la sonda TdP

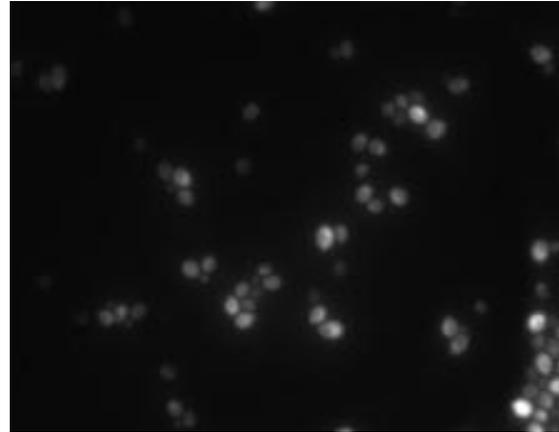


Levadura Td 1D2 con la sonda TdX

Imágenes de las levaduras utilizadas en este estudio del tratamiento con formamida al 30%, objetivo 100X.



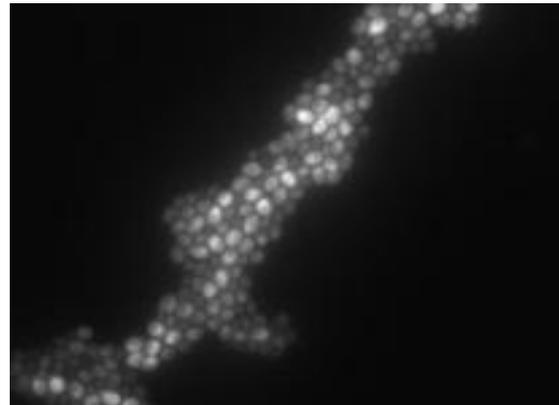
Levaduras observadas con DAPI



Levaduras observadas con la sonda EUK



Levadura Sc 3Y5 con la sonda ScP



Levadura Sc 3Y5 con la sonda ScX



Levadura Td 1D2 con la sonda TdP

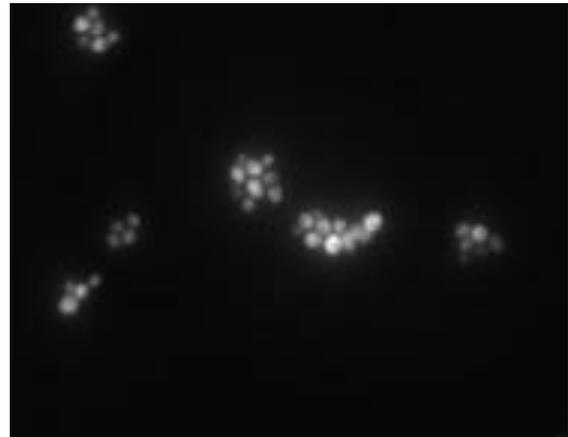


Levadura Td 1D2 con la sonda TdX

Imágenes de las levaduras utilizadas en este estudio del tratamiento con formamida al 25%, objetivo 100X.



Levaduras observadas con DAPI



Levaduras observadas con la sondaEUK



Levadura Sc 3Y5 con la sonda ScP



Levadura Sc 3Y5 con la sonda ScX

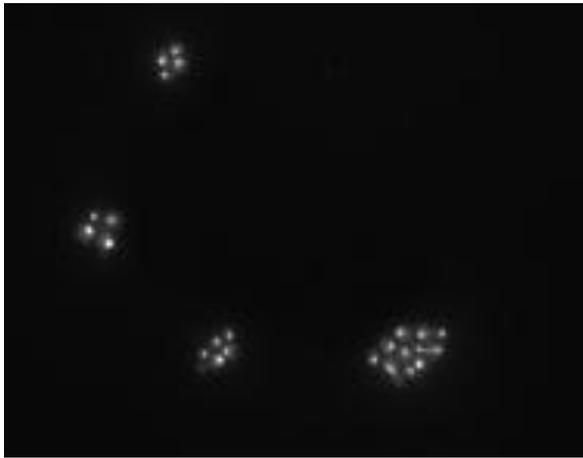


Levadura Td 1D2 con la sonda TdP

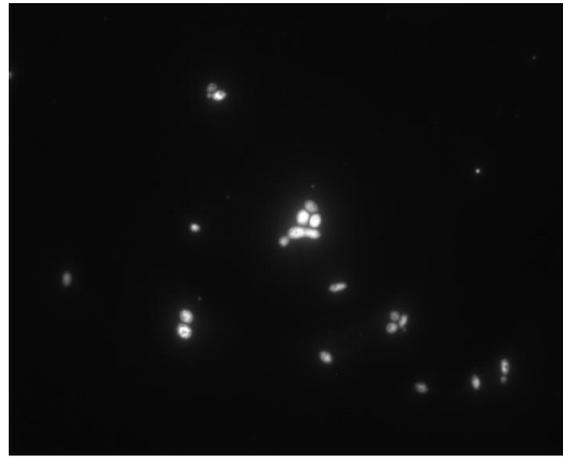


Levadura Td 1D2 con la sonda TdX

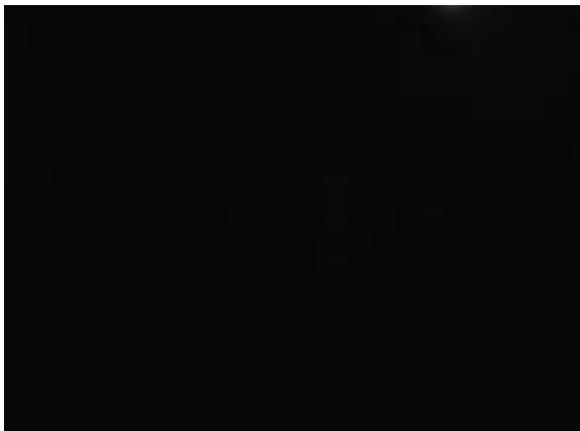
Imágenes de las levaduras utilizadas en este estudio del tratamiento con formamida al 10%, objetivo 100X.



Levaduras observadas con DAPI



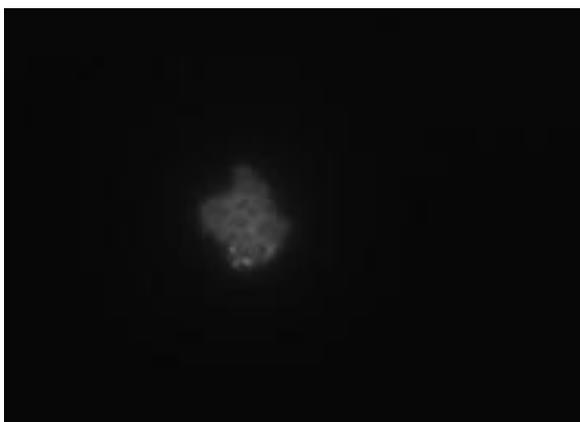
Levaduras observadas con la sonda EUK



Levadura Sc 3Y5 con la sonda ScP



Levadura Sc 3Y5 con la sonda ScX

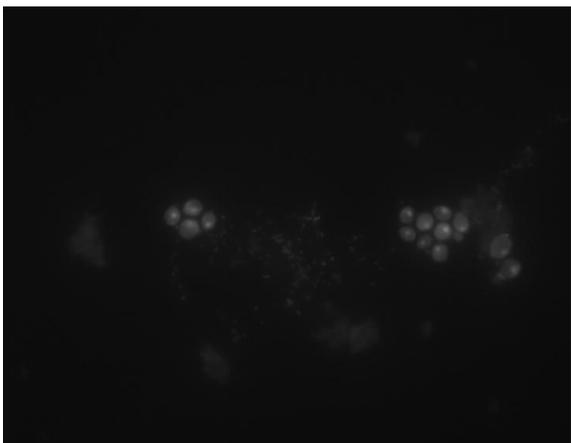


Levadura Td 1D2 con la sonda TdP

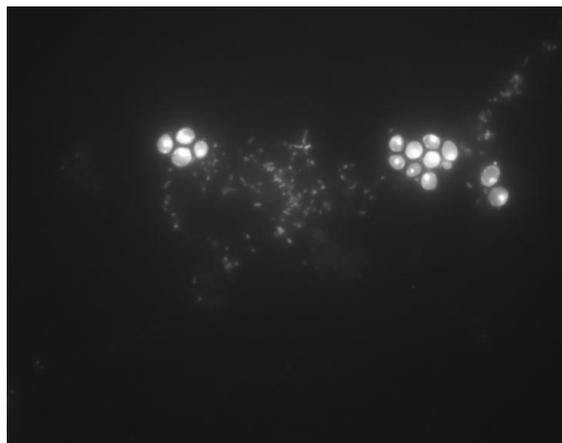


Levadura Td 1D2 con la sonda TdX

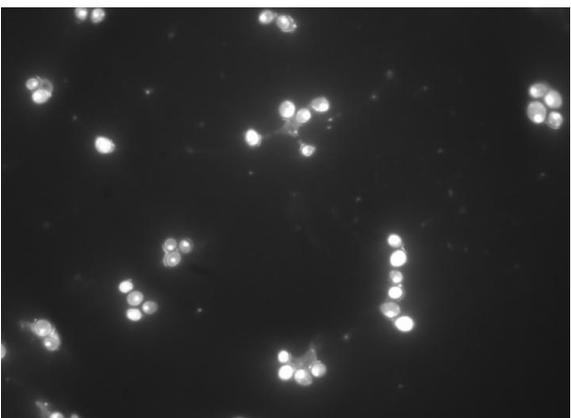
Apéndice 2 Imágenes de las levaduras utilizadas en este estudio de la prueba de restos orgánicos en el medio de mosto. Objetivo 100X.



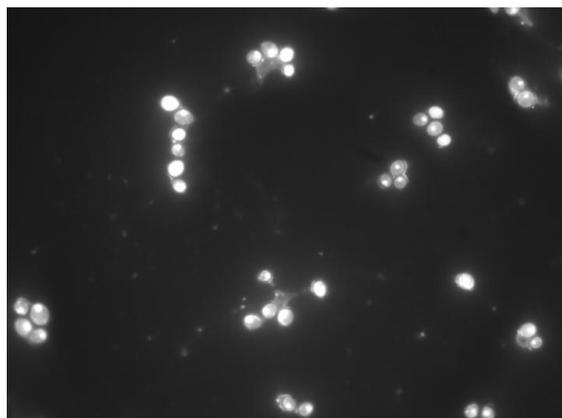
Levadura Sc 3Y5 observada con DAPI



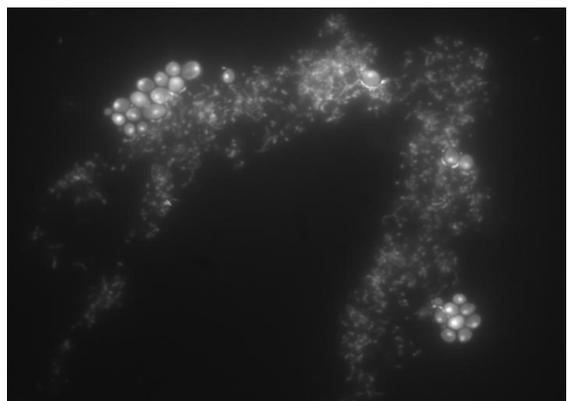
Levadura Sc 3Y5 observada con DAPI



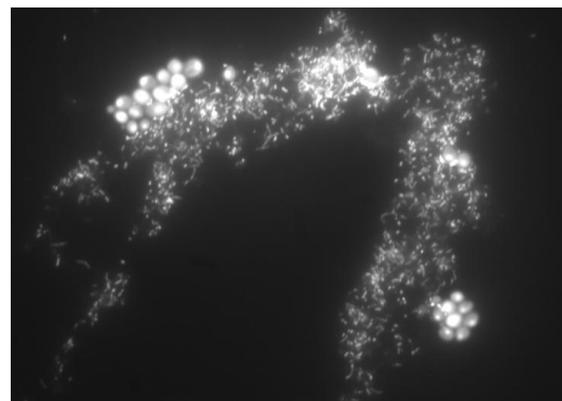
Levadura Km 4D2 observada con DAPI



Levadura Km 4D2 observada con DAPI



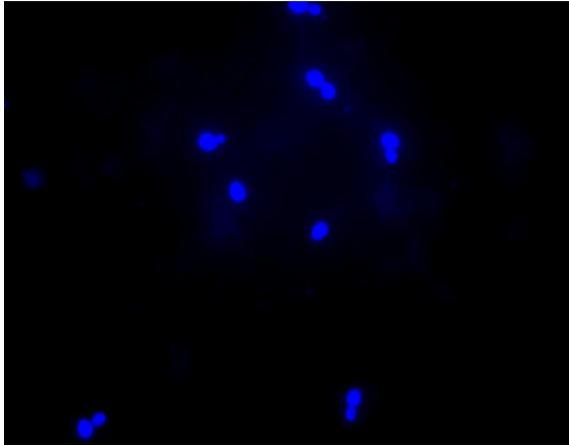
Levadura Td 1D2 observada con DAPI



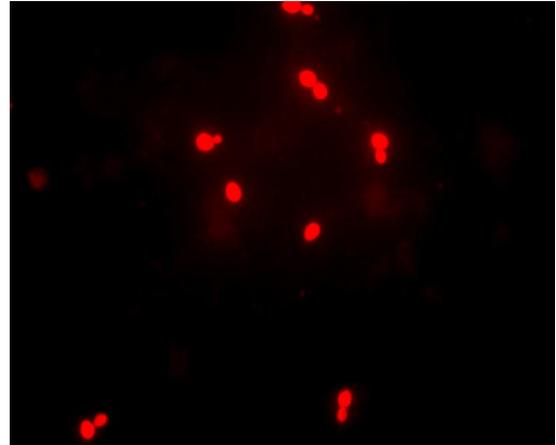
Levadura Td 1D2 observada con DAPI

Apéndice 3 Imágenes de las levaduras utilizadas en este estudio del seguimiento de la dinámica poblacional utilizando FISH en medio sintético.

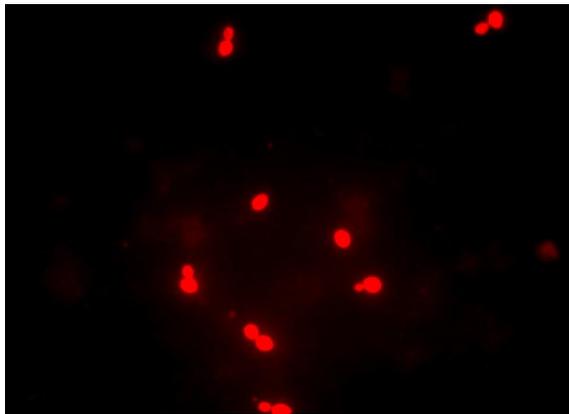
(0 hs), objetivo 100X.



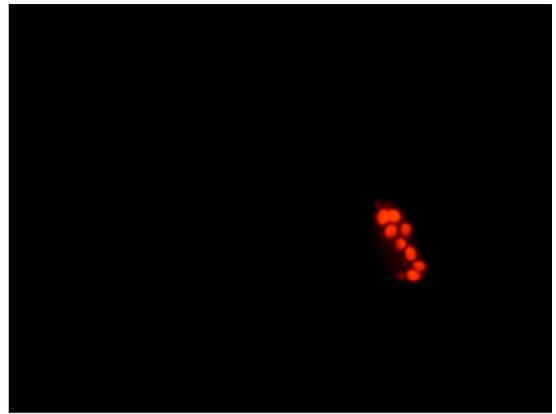
Levaduras observadas con DAPI



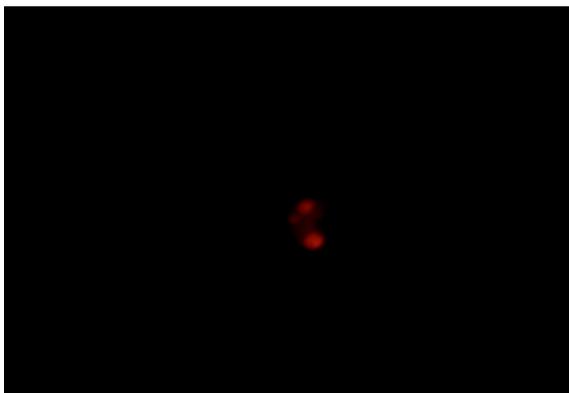
Levaduras observadas con la sonda EUK



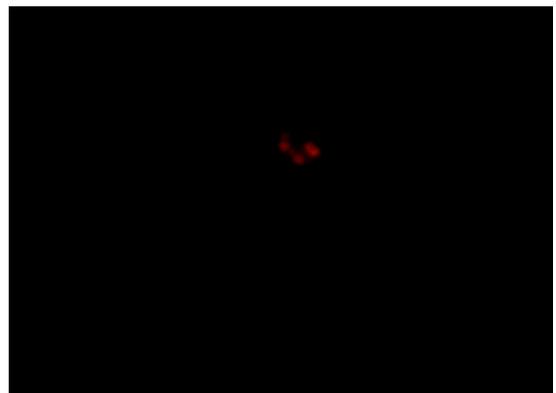
Levaduras observadas con la sonda FUNK



Levadura Sc 3Y5 con la sonda ScX

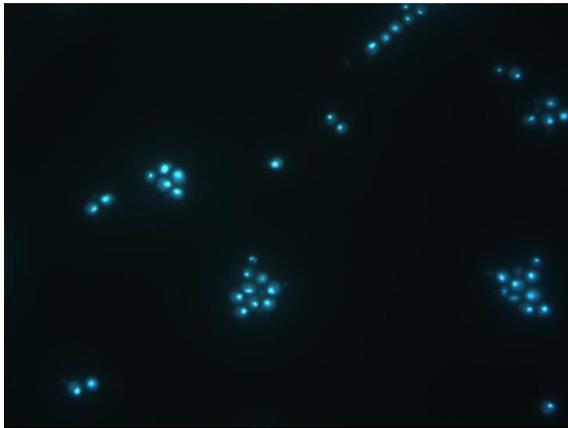


Levadura Km 4D2 con la sonda KmX

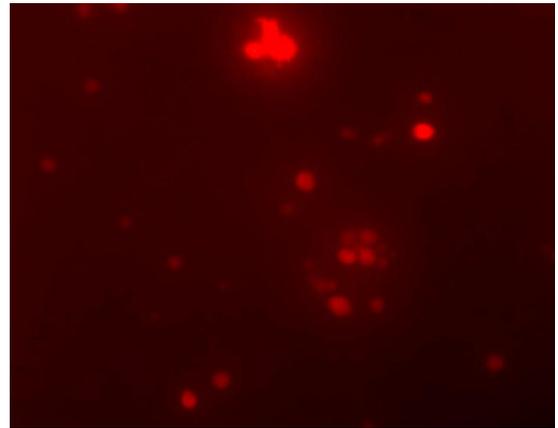


Levadura Td 1D2 con la sonda TdX

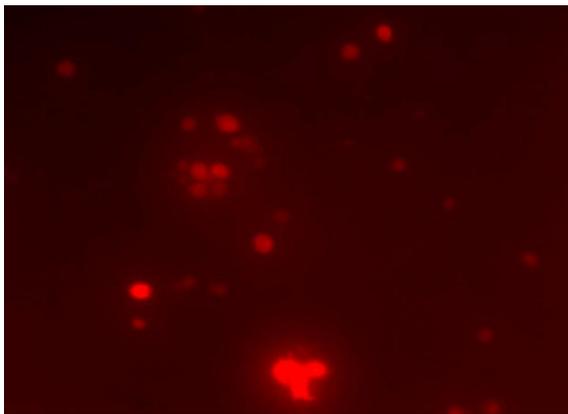
Imágenes de las levaduras utilizadas en este estudio del seguimiento de la dinámica poblacional utilizando FISH en medio sintético (24 hs), objetivo 100X.



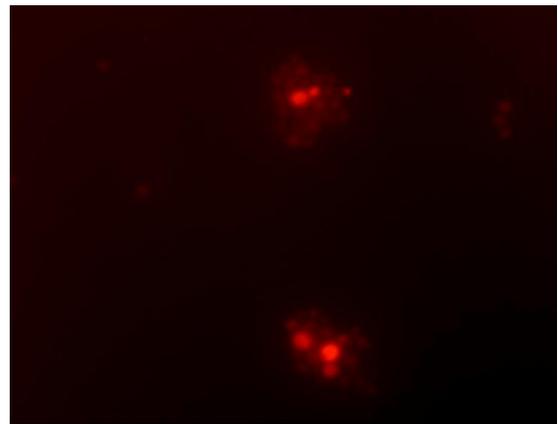
Levaduras observadas con DAPI



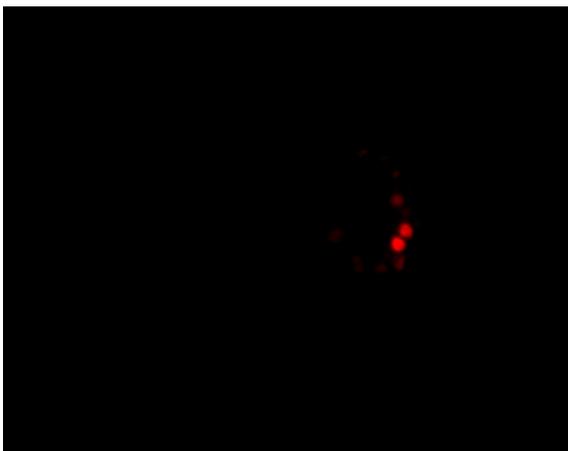
Levaduras observadas con la sonda EUK



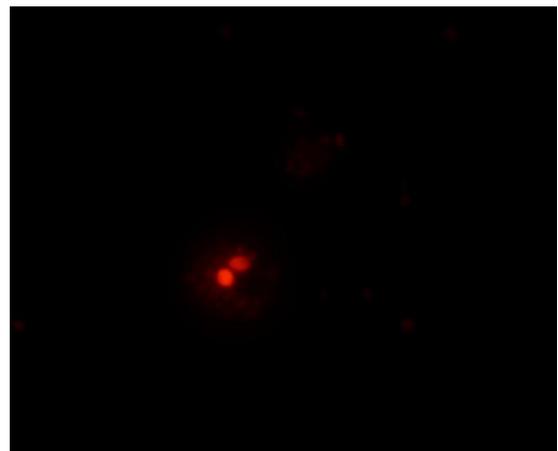
Levaduras observadas con la sonda FUNK



Levadura Sc 3Y5 con la sonda ScX

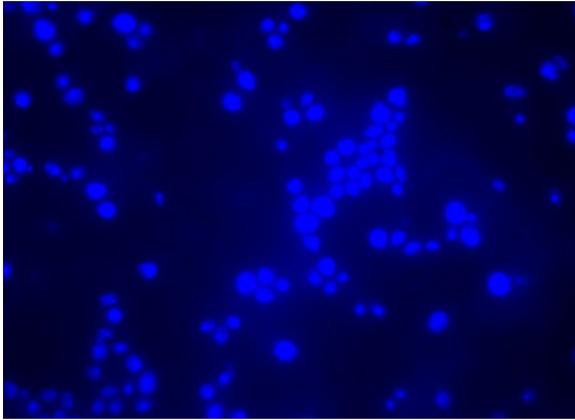


Levadura Km 4D2 con la sonda KmX

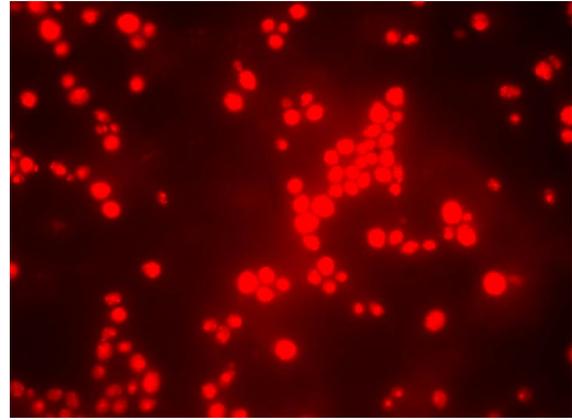


Levadura Td 1D2 con la sonda TdX

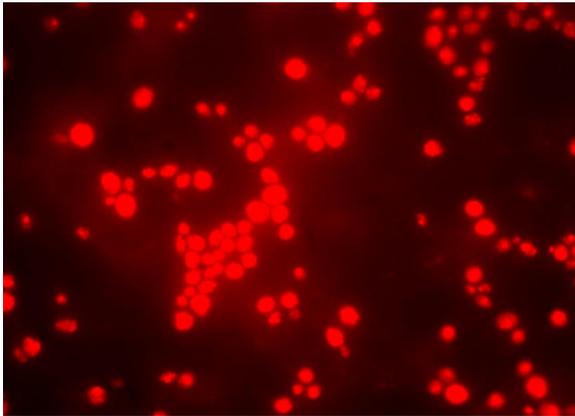
Imágenes de las levaduras utilizadas en este estudio del seguimiento de la dinámica poblacional utilizando FISH en medio sintético (48 hs), objetivo 100X.



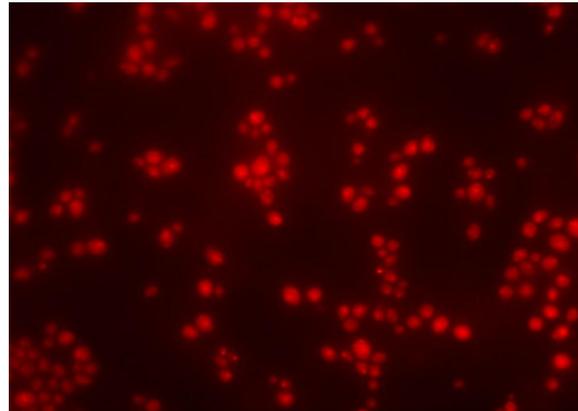
Levaduras observadas con DAPI



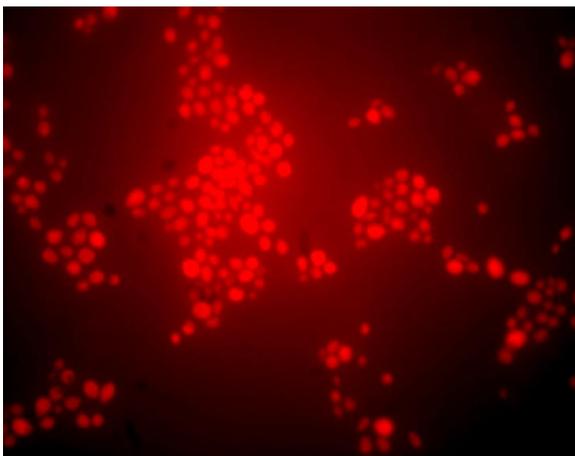
Levaduras observadas con la sonda EUK



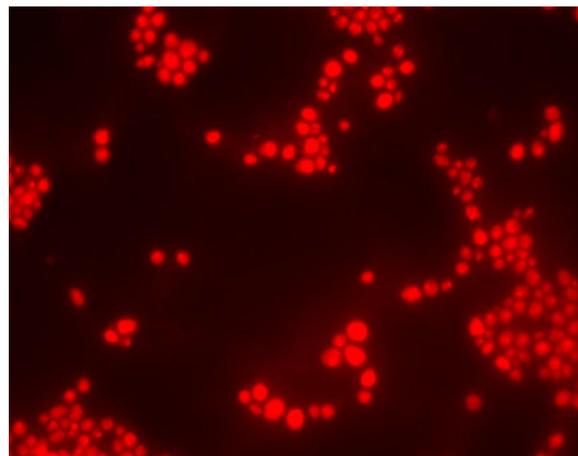
Levaduras observadas con la sonda FUNK



Levadura Sc 3Y5 con la sonda ScX

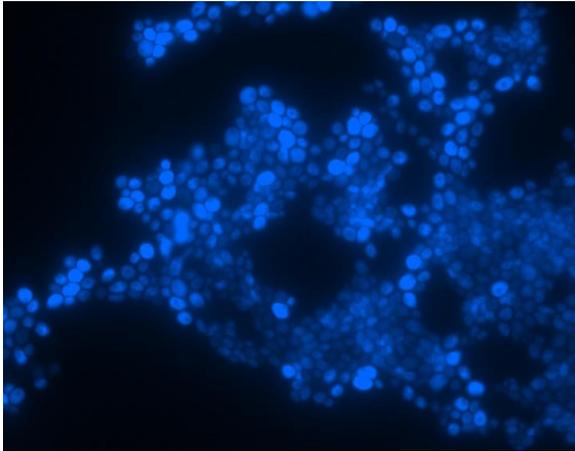


Levadura Km 4D2 con la sonda KmX

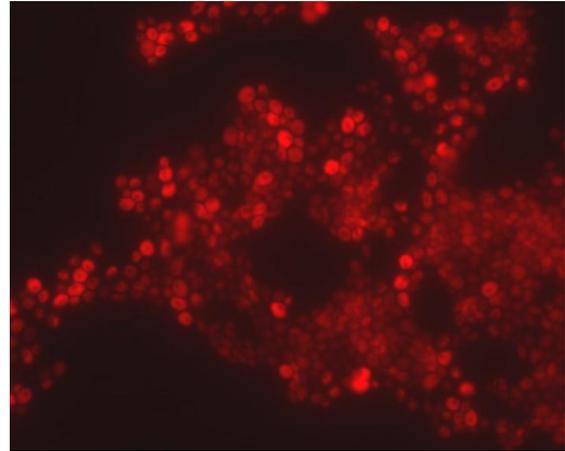


Levadura Td 1D2 con la sonda TdX

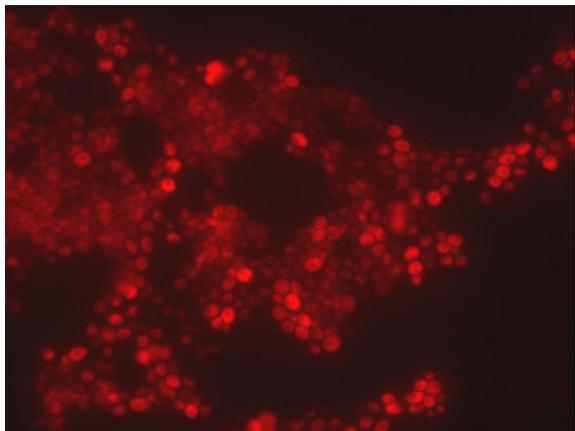
Imágenes de las levaduras utilizadas en este estudio del seguimiento de la dinámica poblacional utilizando FISH en medio sintético (60 hs), objetivo 100X.



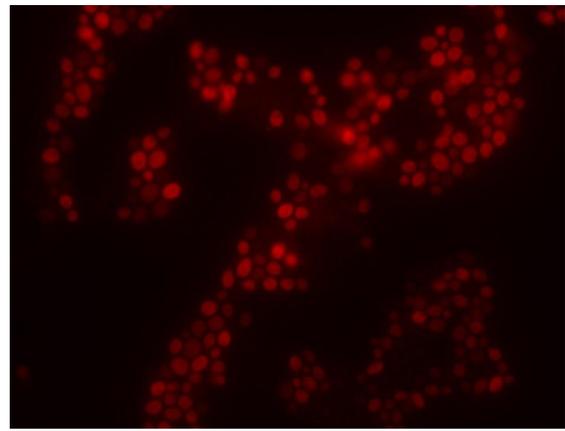
Levaduras observadas con DAPI



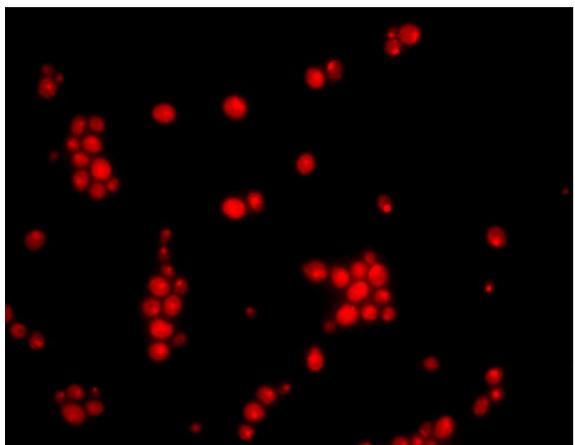
Levaduras observadas con la sonda EUK



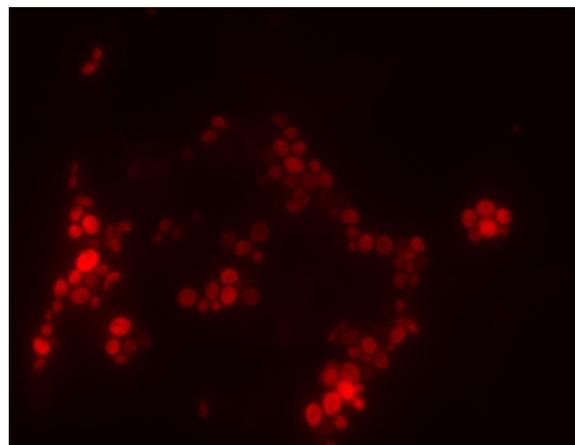
Levaduras observadas con la sonda FUNK



Levadura Sc 3Y5 con la sonda ScX

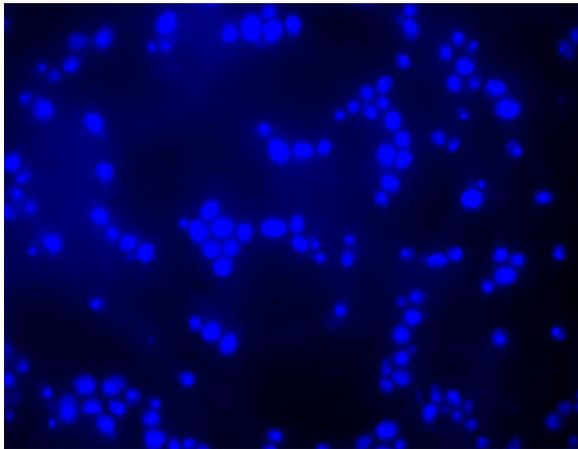


Levadura Km 4D2 con la sonda KmX

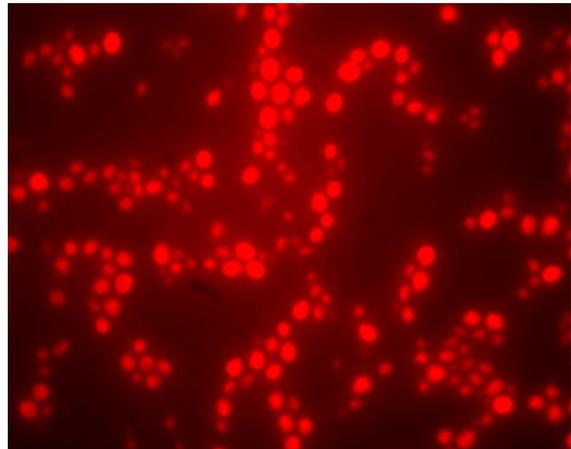


Levadura Td 1D2 con la sonda TdX

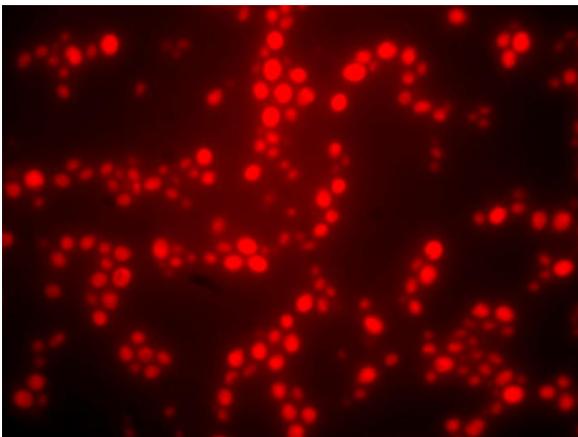
Imágenes de las levaduras utilizadas en este estudio del seguimiento de la dinámica poblacional utilizando FISH en medio sintético (84 hs), objetivo 100X.



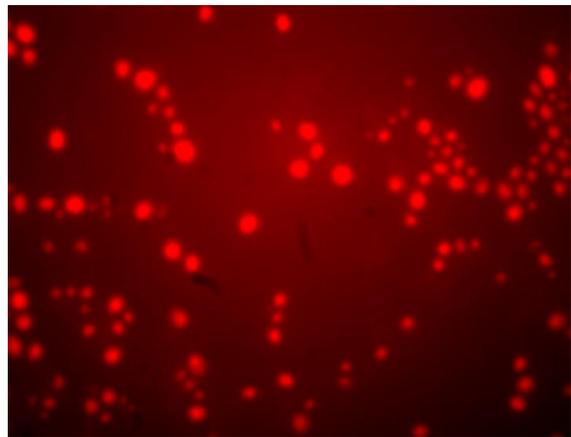
Levaduras observadas con DAPI



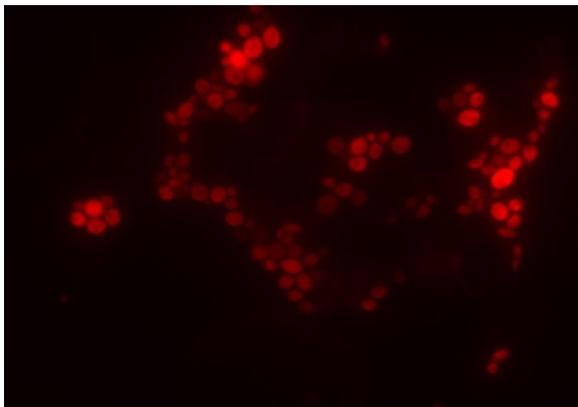
Levaduras observadas con la sonda EUK



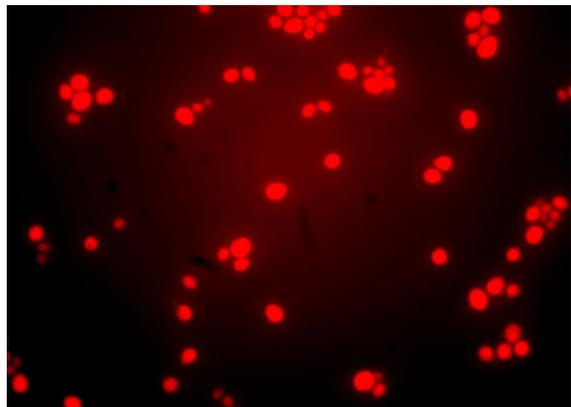
Levaduras observadas con la sonda FUNK



Levadura Sc 3Y5 con la sonda ScX

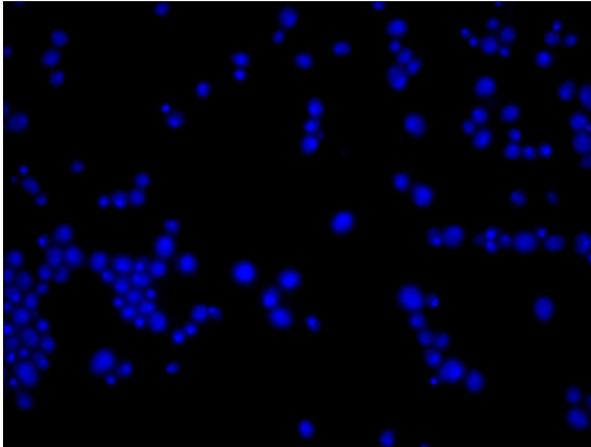


Levadura Km 4D2 con la sonda KmX

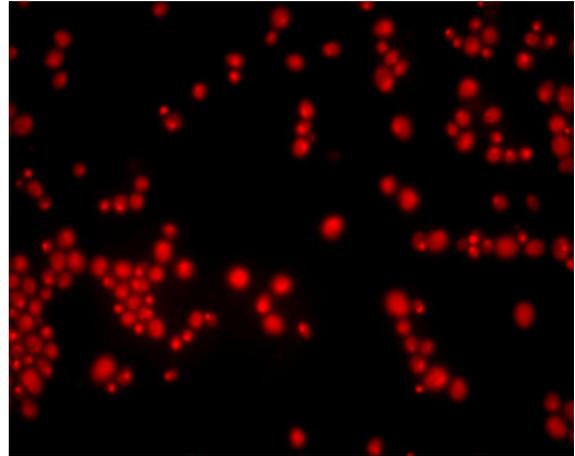


Levadura Td 1D2 con la sonda TdX

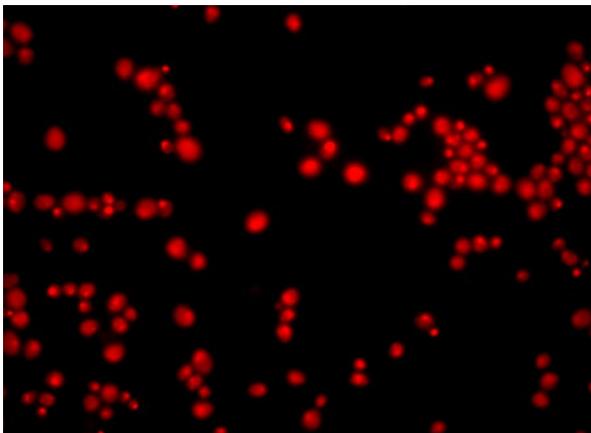
Imágenes de las levaduras utilizadas en este estudio del seguimiento de la dinámica poblacional utilizando FISH en medio sintético (120 hs), objetivo 100X.



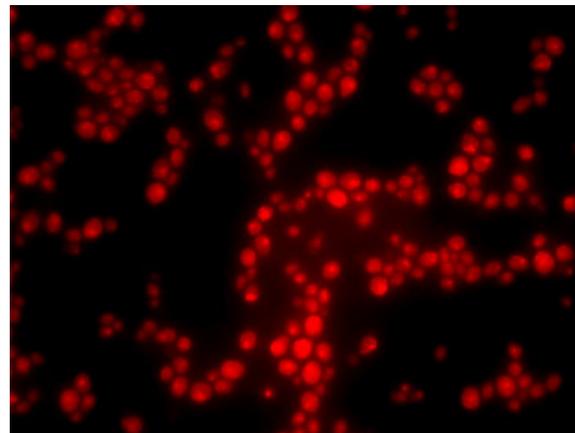
Levaduras observadas con DAPI



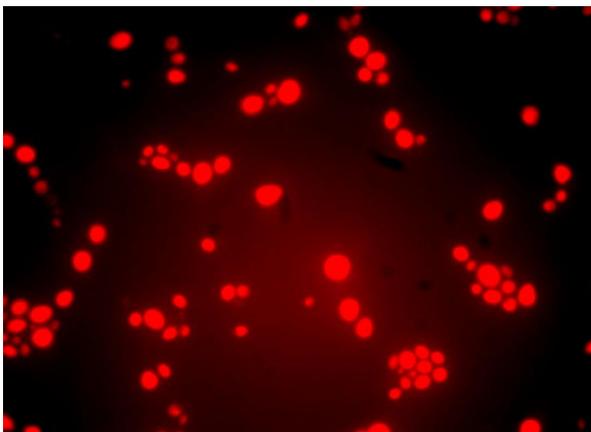
Levaduras observadas con la sonda EUK



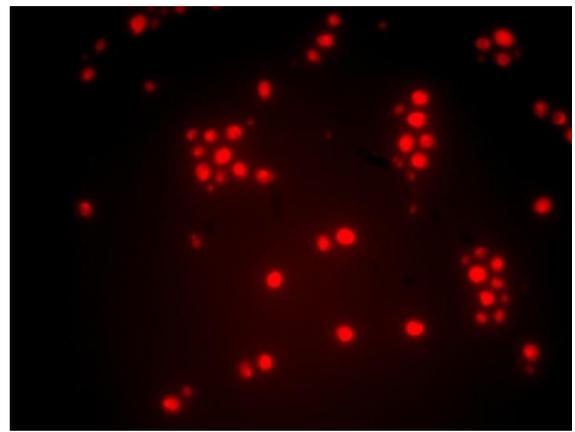
Levaduras observadas con la sonda FUNK



Levadura Sc 3Y5 con la sonda ScX



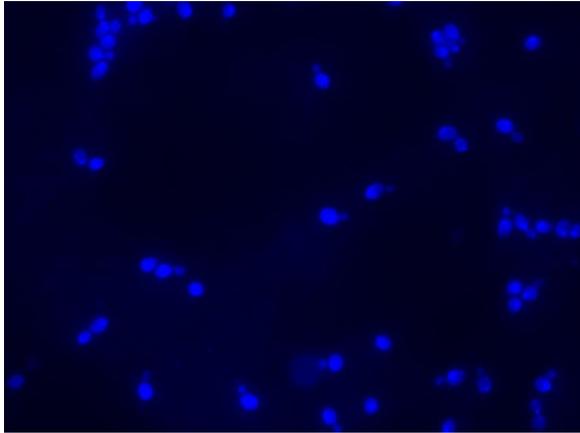
Levadura Km 4D2 con la sonda KmX



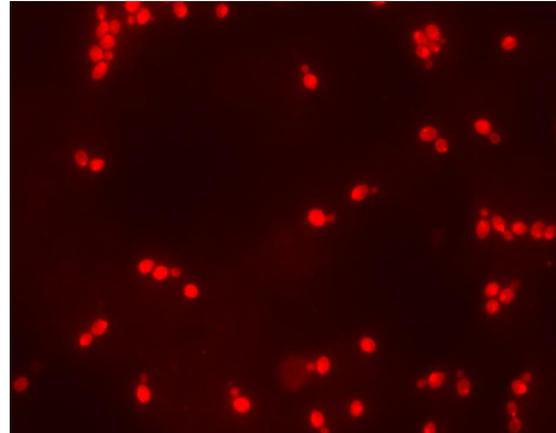
Levadura Td 1D2 con la sonda TdX

Apéndice 4 Imágenes de las levaduras utilizadas en este estudio del seguimiento de la dinámica poblacional utilizando FISH en medio de mosto.

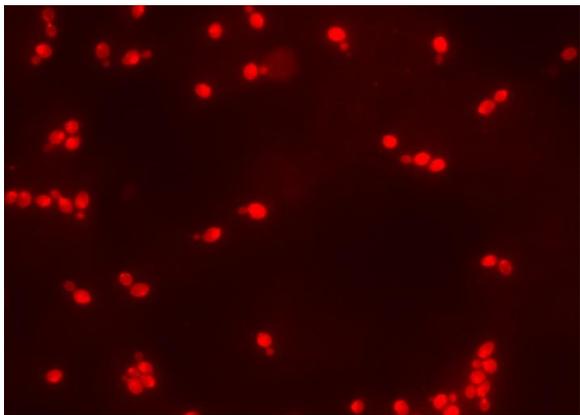
(0 hs), objetivo 100X.



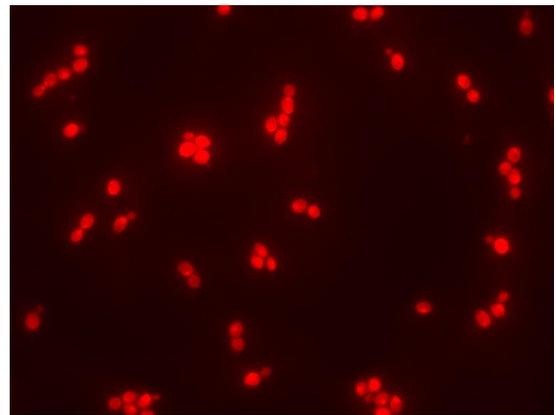
Levaduras observadas con DAPI



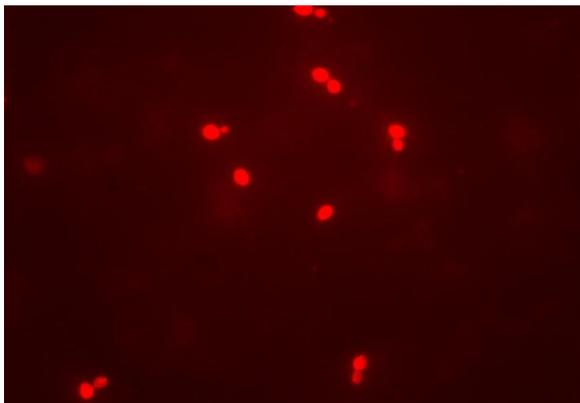
Levaduras observadas con la sonda EUK



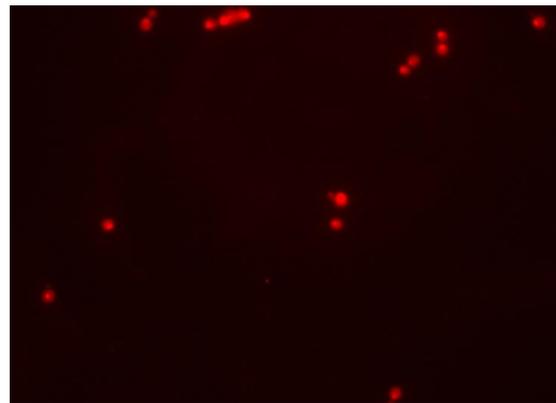
Levaduras observadas con la sonda FUNK



Levadura Sc 3Y5 con la sonda ScX

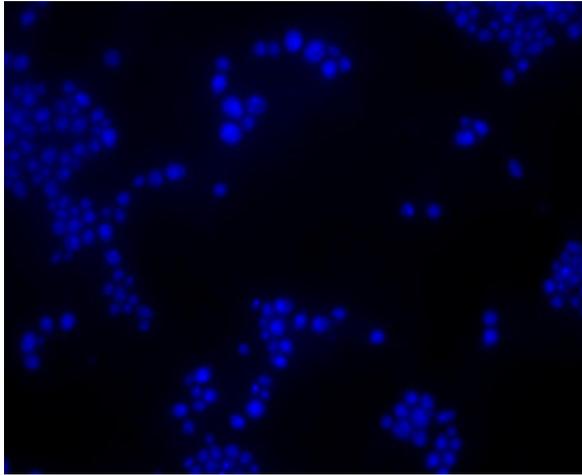


Levadura Km 4D2 con la sonda KmX

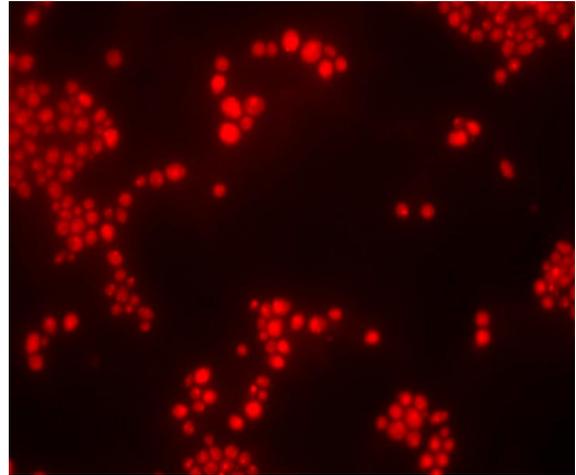


Levadura Td 1D2 con la sonda TdX

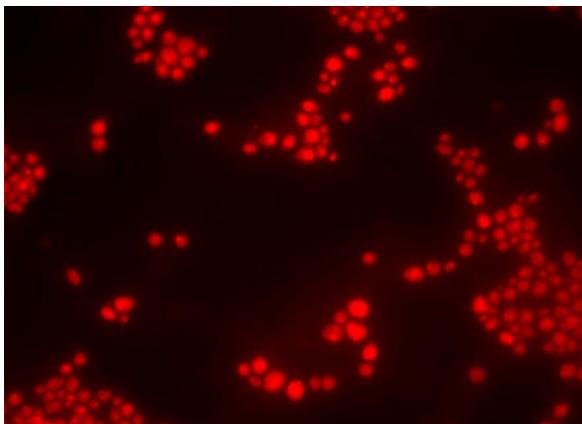
Imágenes de las levaduras utilizadas en este estudio del seguimiento de la dinámica poblacional utilizando FISH en medio de mosto (24 hs), objetivo 100X.



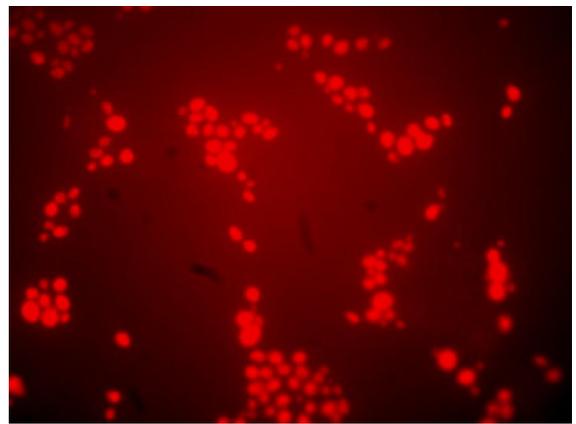
Levaduras observadas con DAPI



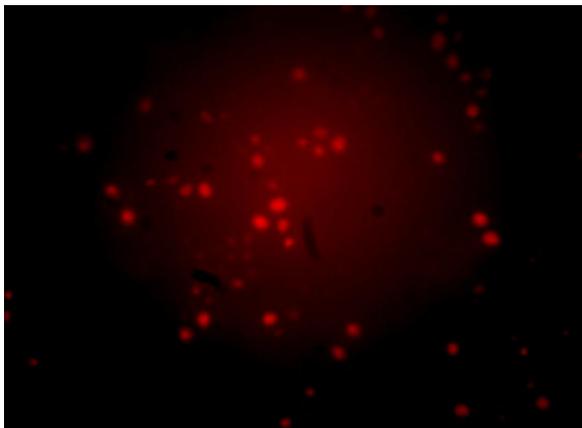
Levaduras observadas con la sonda EUK



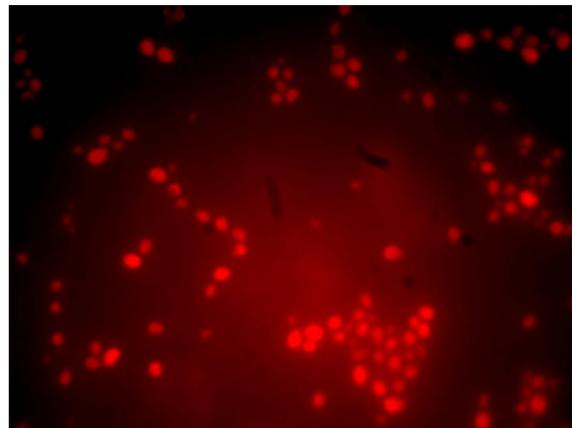
Levaduras observadas con la sonda FUNK



Levadura Sc 3Y5 con la sonda ScX

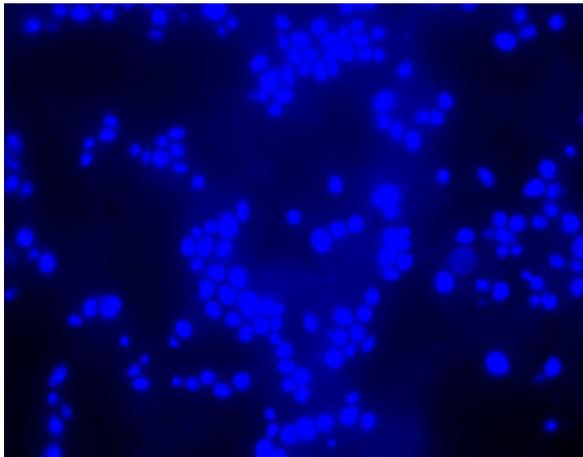


Levadura Km 4D2 con la sonda KmX

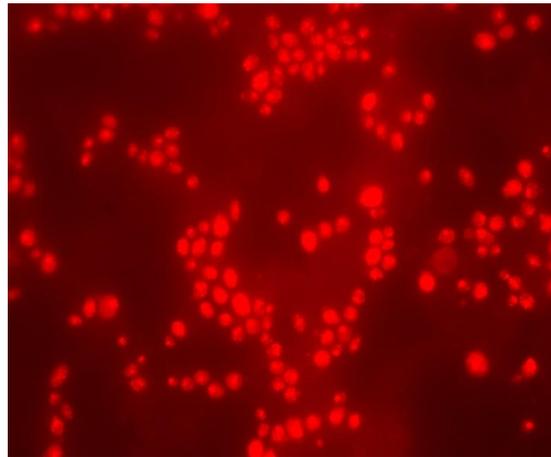


Levadura Td 1D2 con la sonda TdX

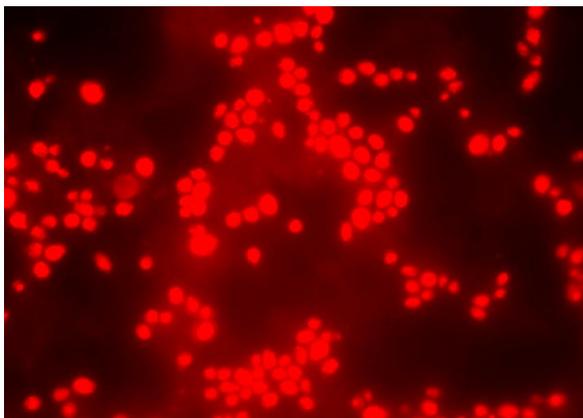
Imágenes de las levaduras utilizadas en este estudio del seguimiento de la dinámica poblacional utilizando FISH en medio de mosto (48 hs), objetivo 100X.



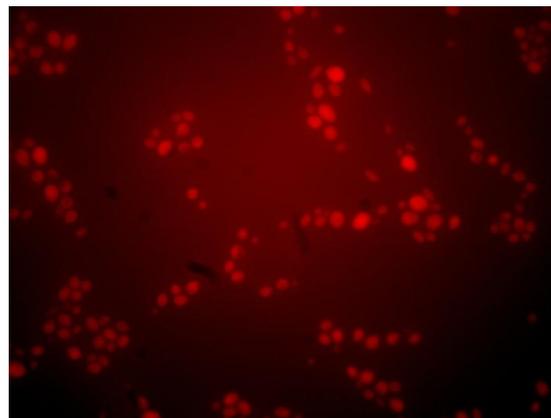
Levaduras observadas con DAPI



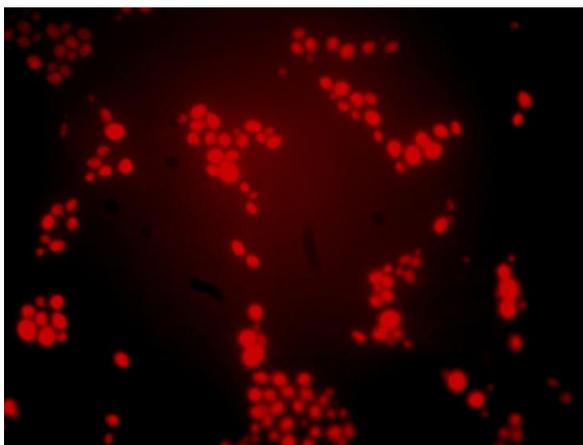
Levaduras observadas con la sonda EUK



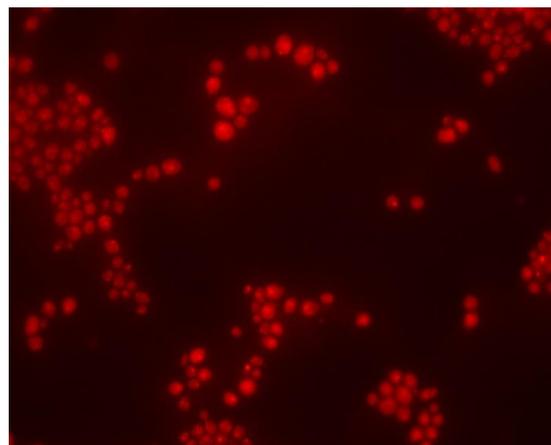
Levaduras observadas con la sonda FUNK



Levadura Sc 3Y5 con la sonda ScX

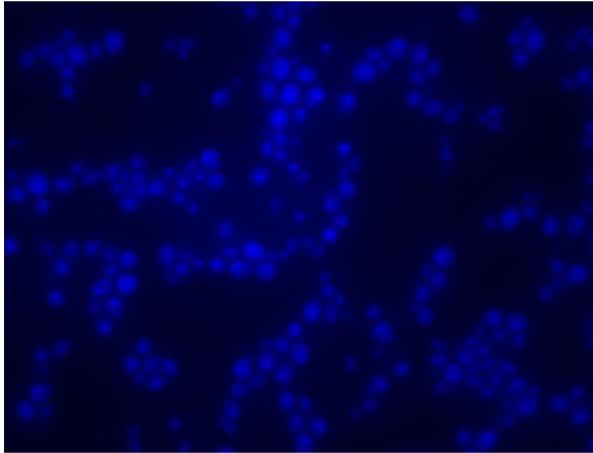


Levadura Km 4D2 con la sonda KmX

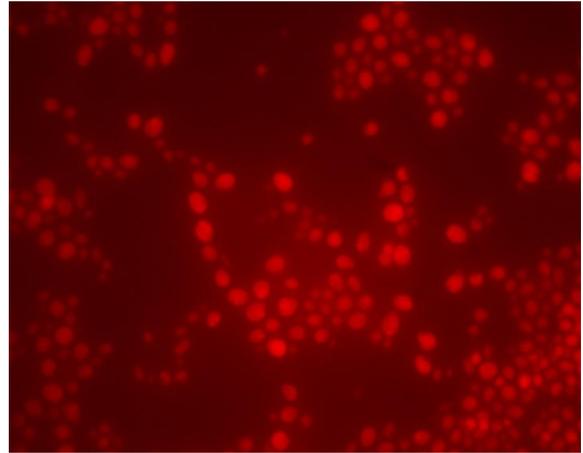


Levadura Td 1D2 con la sonda TdX

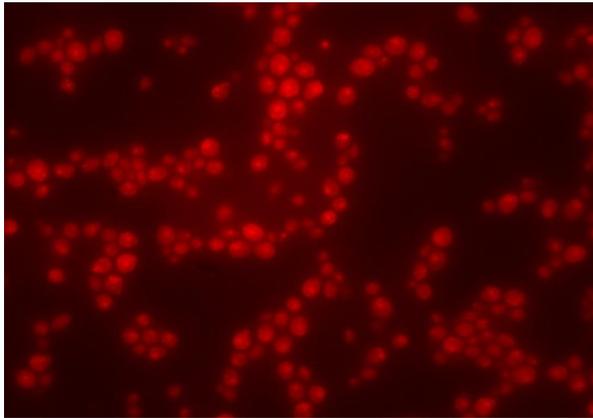
Imágenes de las levaduras utilizadas en este estudio del seguimiento de la dinámica poblacional utilizando FISH en medio de mosto (60 hs), objetivo 100X.



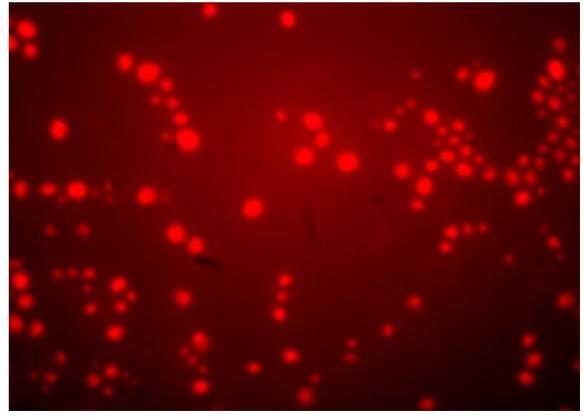
Levaduras observadas con DAPI



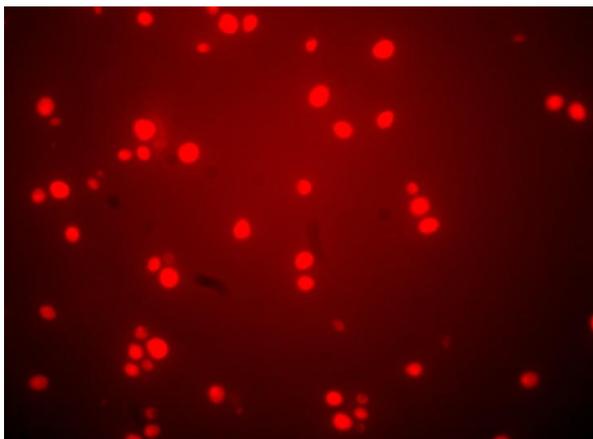
Levaduras observadas con la sonda EUK



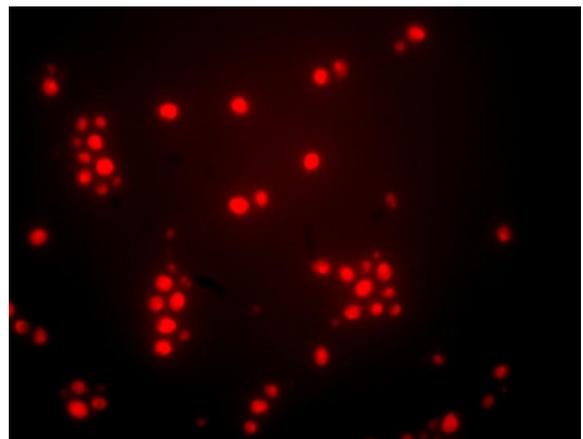
Levaduras observadas con la sonda FUNK



Levadura Sc 3Y5 con la sonda ScX

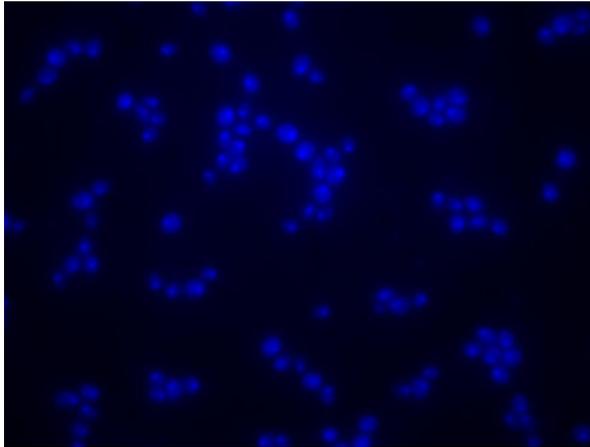


Levadura Km 4D2 con la sonda KmX

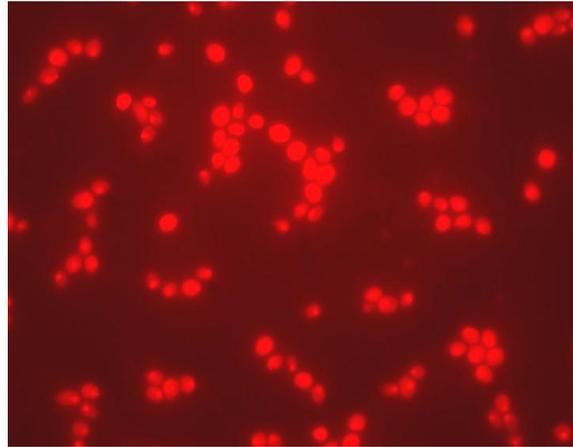


Levadura Td 1D2 con la sonda TdX

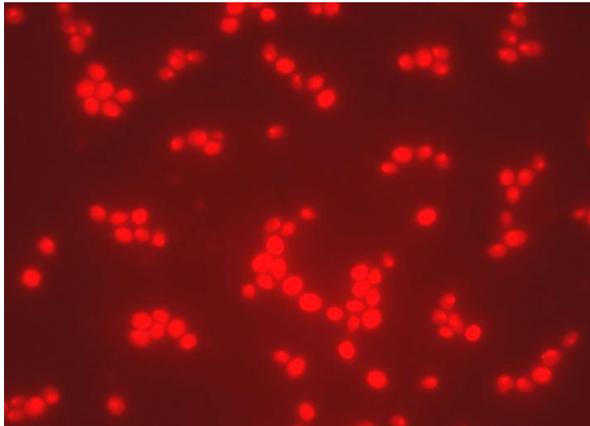
Imágenes de las levaduras utilizadas en este estudio del seguimiento de la dinámica poblacional utilizando FISH en medio de mosto (84 hs), objetivo 100X.



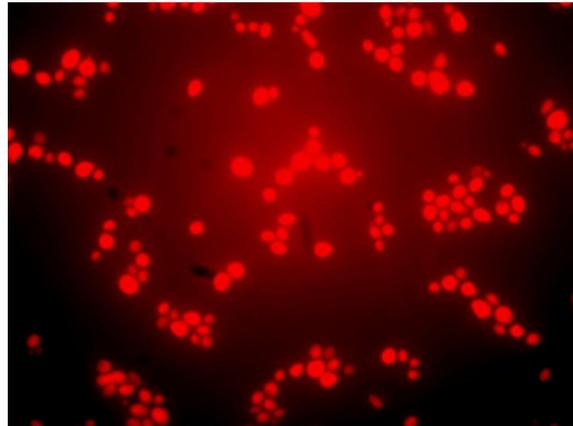
Levaduras observadas con DAPI



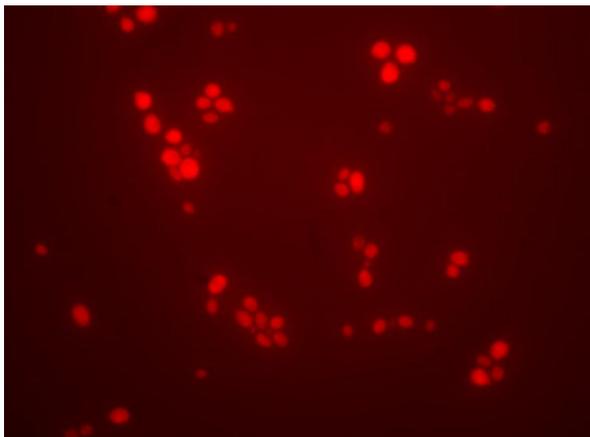
Levaduras observadas con la sonda EUK



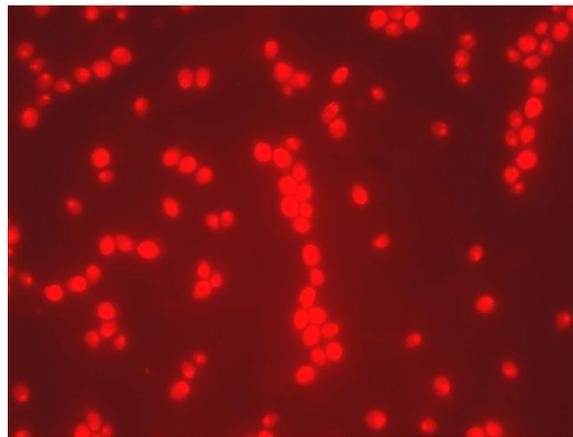
Levaduras observadas con la sonda FUNK



Levadura Sc 3Y5 con la sonda ScX

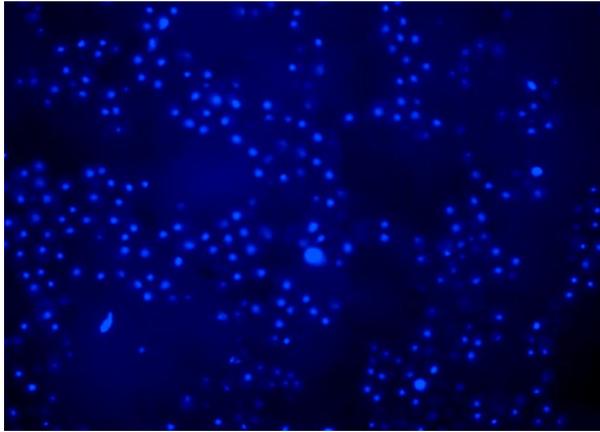


Levadura Km 4D2 con la sonda KmX

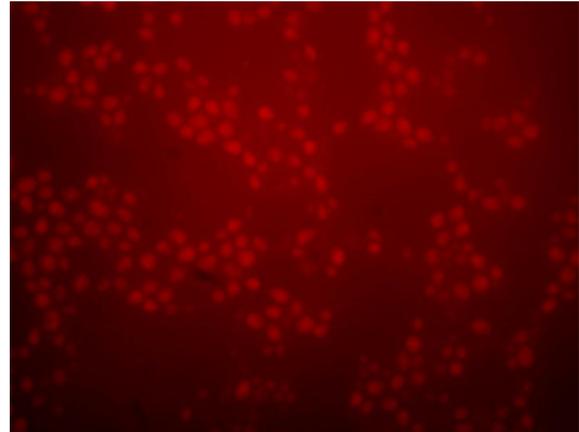


Levadura Td 1D2 con la sonda TdX

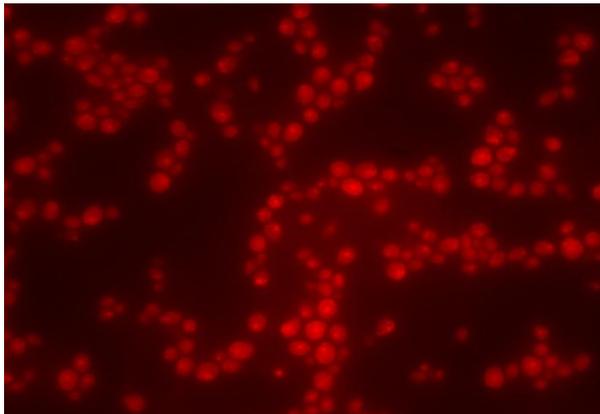
Imágenes de las levaduras utilizadas en este estudio del seguimiento de la dinámica poblacional utilizando FISH en medio de mosto (120 hs), objetivo 100X.



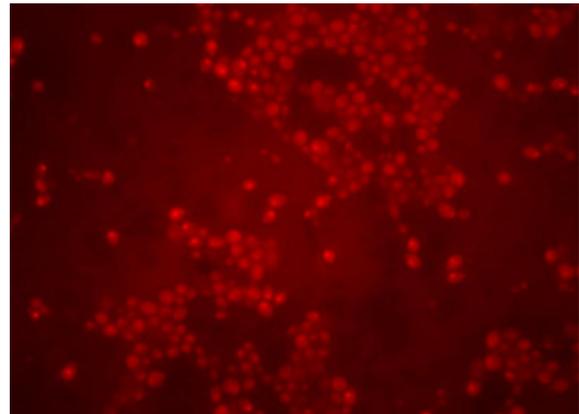
Levaduras observadas con DAPI



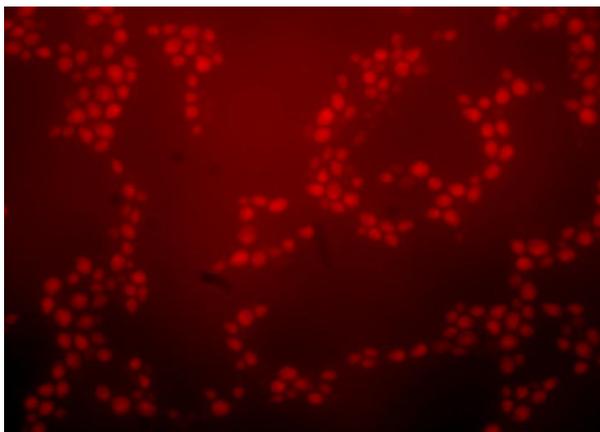
Levaduras observadas con la sonda EUK



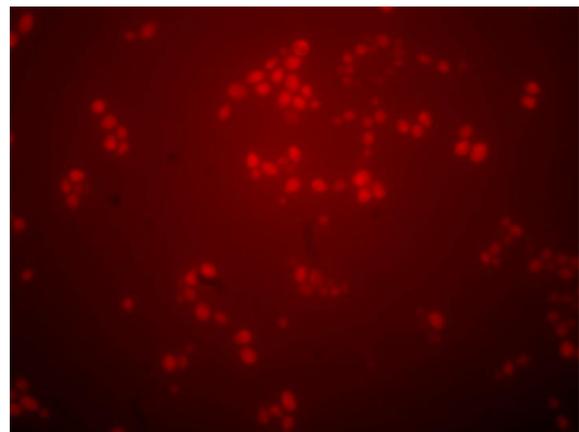
Levaduras observadas con la sonda FUNK



Levadura Sc 3Y5 con la sonda ScX



Levadura Km 4D2 con la sonda KmX



Levadura Td 1D2 con la sonda TdX

Apéndice 5. Fórmulas utilizadas en este estudio para el cálculo de los parámetros de crecimiento y cinéticos de cultivos.

Tasa específica de crecimiento:

$$\mu = 1/x \, dx/dt$$

Integrando la expresión:

$$\mu \, dt = dx/x$$

$$\int \mu \, dt = \int dx/x$$

y para la fase log donde μ es constante:

$$\mu \int_{t_1}^{t_2} dt = \int_{x_1}^{x_2} dx/x$$

$$\mu (t_2 - t_1) = \ln x_2 - \ln x_1$$

$$\mu = (\ln x_2 - \ln x_1) / (t_2 - t_1) \text{ ó } \mu = (\ln x_2/x_1) / \Delta t$$

Tiempo de duplicación.- se define como el tiempo en que se duplica la biomasa o sea:

$$x_2/x_1 = 2$$

$$\mu = \ln 2/\Delta t$$

$$\Delta t = \ln 2/\mu$$

En levaduras y bacterias el efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de crecimiento puede verse por el modelo de Monod:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S}$$

Donde:

μ_{\max} .- velocidad máxima de crecimiento específico del microorganismo ante el sustrato limitante. (S)

S.- concentración del sustrato limitante.

K_s .- constante de saturación (que se interpreta como inversamente proporcional a la afinidad del microorganismo por el sustrato limitante).

Rendimiento.- Cantidad relativa producida de un compuesto (metabolito ó biomasa) por unidad de sustrato consumido (Y).

El rendimiento celular se define como:

$$Y_{X/S} = - dX / dS$$

X y S representan la concentración de biomasa y sustrato, respectivamente. En la práctica, para el cálculo del $Y_{X/S}$ se emplea la expresión:

$$Y_{X/S} = - \Delta X / \Delta S$$

El rendimiento de producto está dado por:

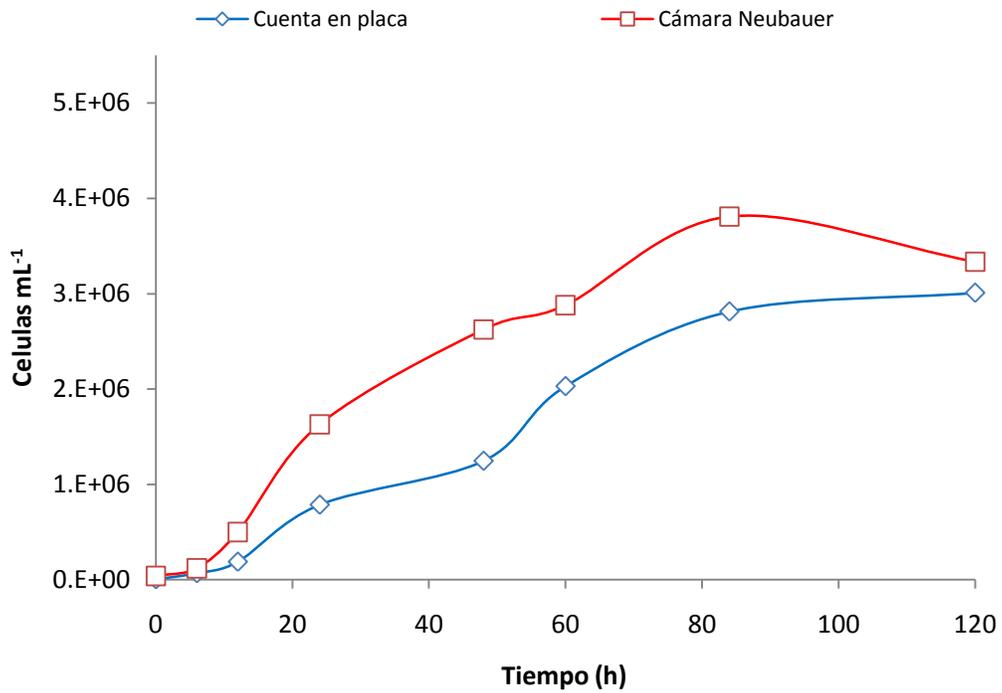
$$Y_{P/S} = - \Delta P / \Delta S$$

La velocidad de consumo de sustrato se expresa como:

$$q_S = \mu / Y_{X/S}$$

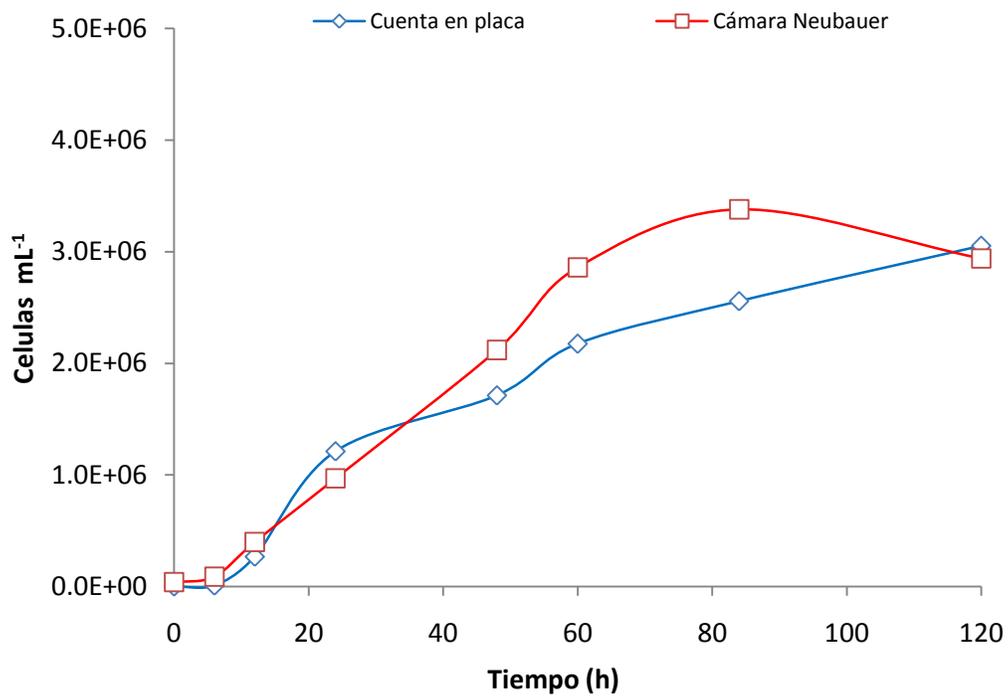
Apéndice 6 Conteo en placa y cámara de Neubauer en medio de mosto

Tiempo (h)	Cuenta en placa	Cámara Neubauer
	(Células mL ⁻¹)	
0	5500	40000
6	70000	120000
12	189500	500000
24	787500	1630000
48	1247000	2625000
60	2030000	2880000
84	2813000	3810000
120	3009500	3335000

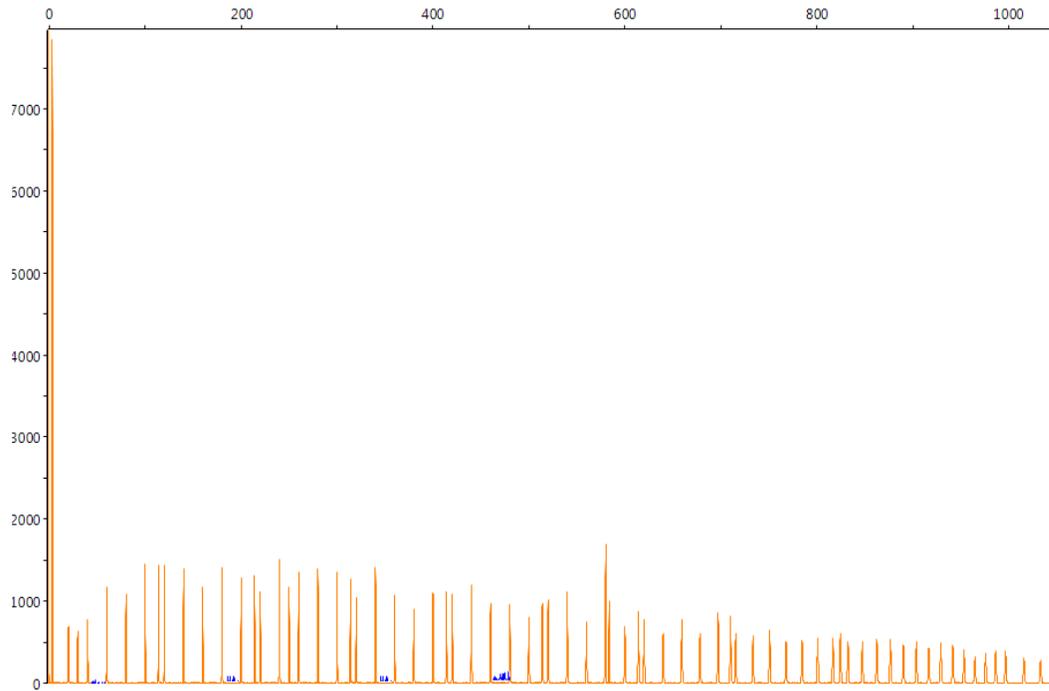


Apéndice 7 Conteo en placa y cámara de Neubauer en medio sintético

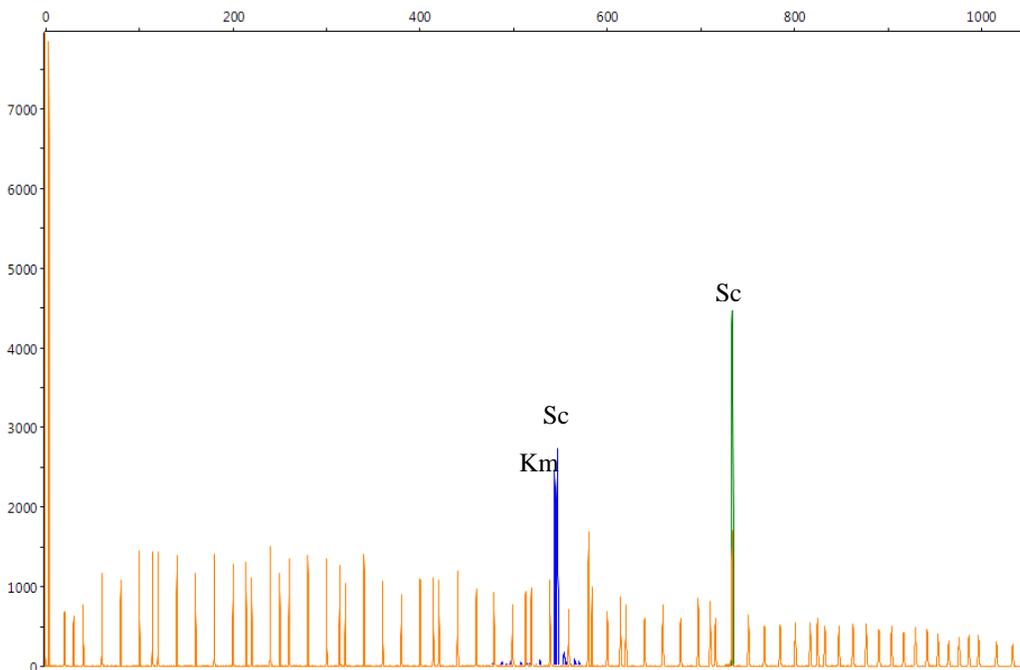
Tiempo (h)	Cuenta en placa	Cámara Neubauer
	(Células mL ⁻¹)	
0	1500	40000
6	10000	90000
12	268500	400000
24	1212000	970000
48	1713000	2120000
60	2176000	2860000
84	2557000	3380000
120	3053000	2940000



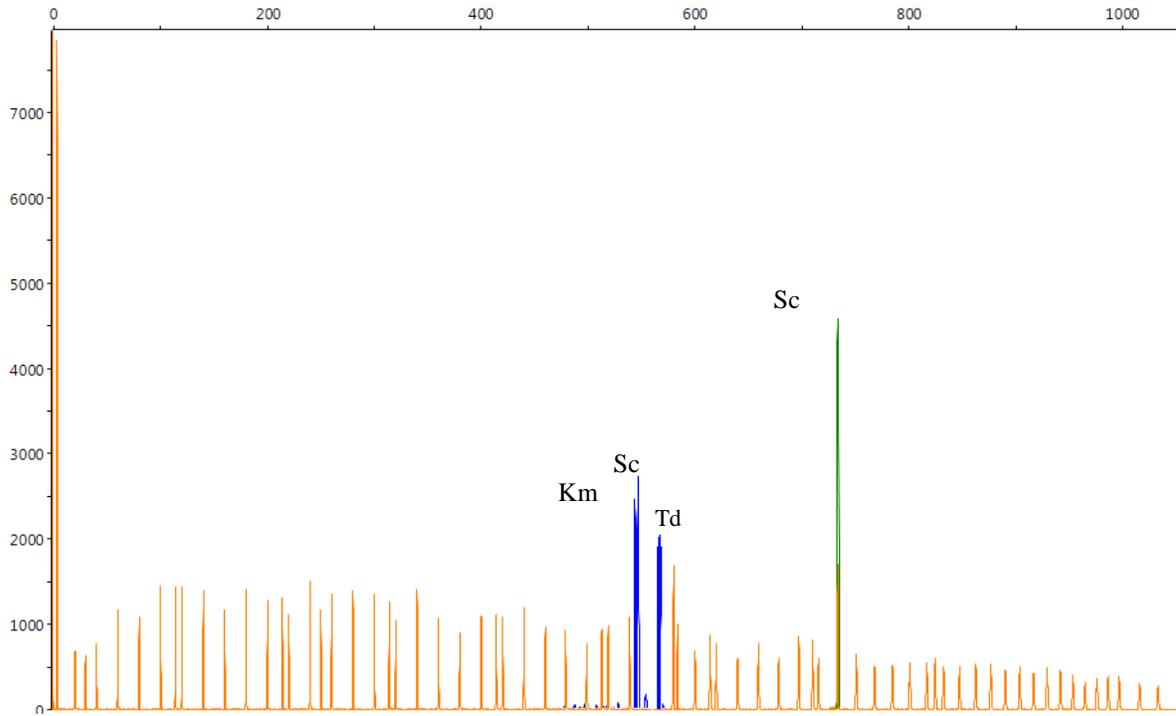
Apéndice 8 Electroferogramas obtenidos de las levaduras utilizadas en este estudio durante el seguimiento de la dinámica poblacional utilizando ARISA en medio sintético.



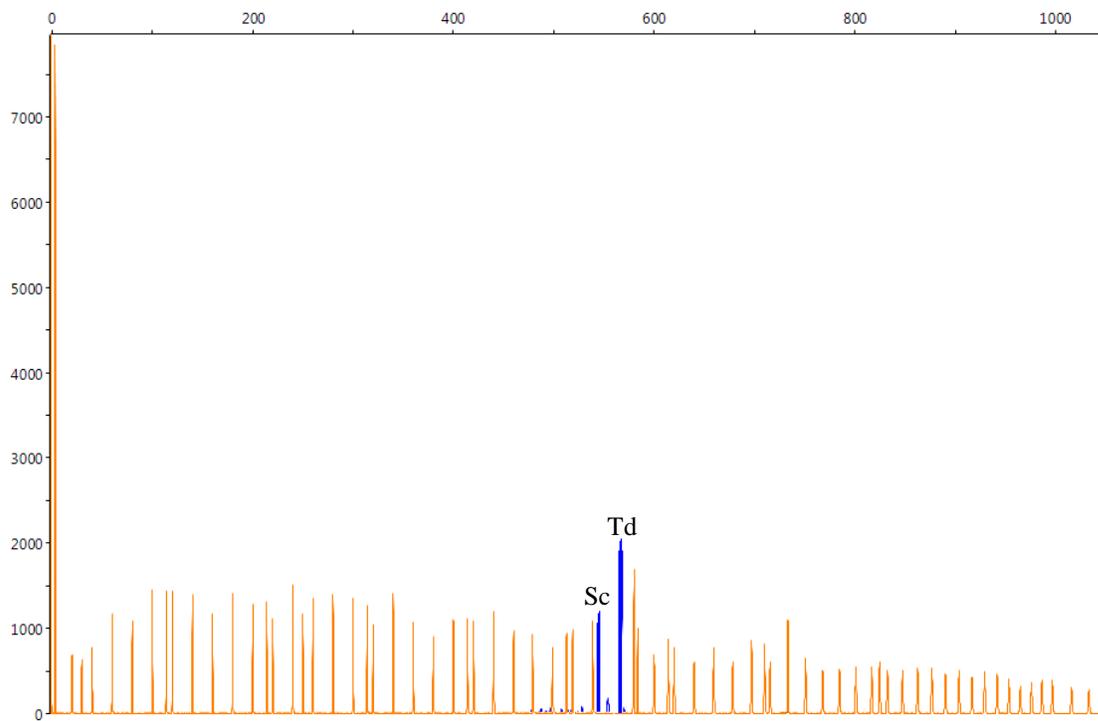
Muestra de las 0 hs.



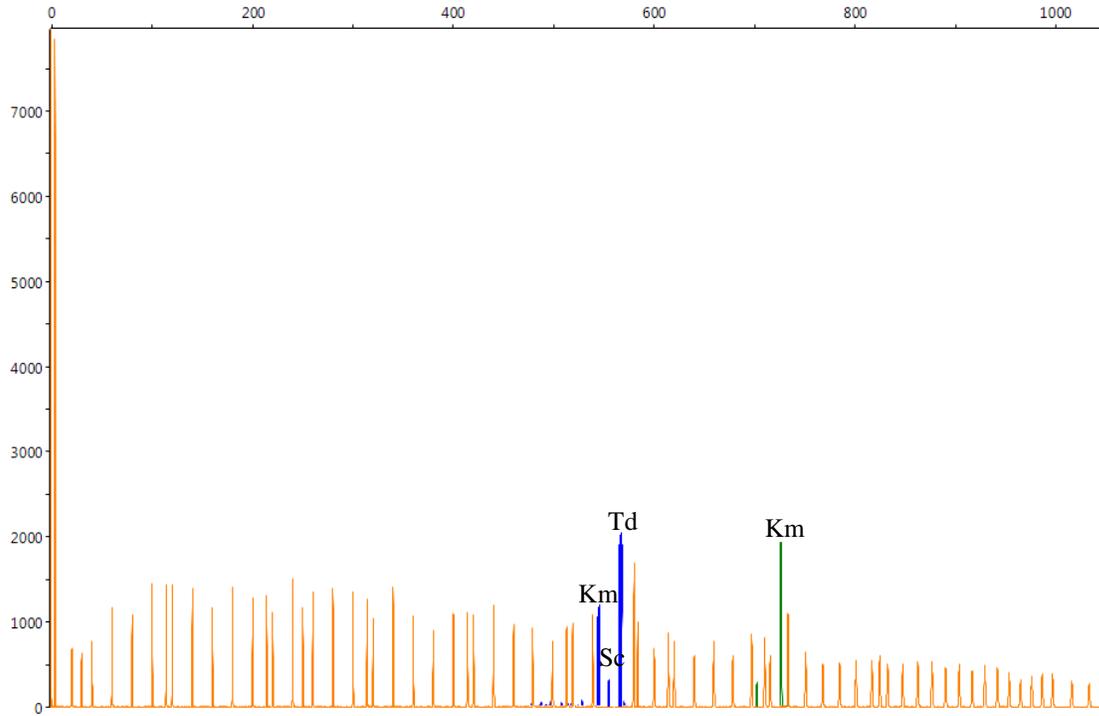
Electroferograma obtenido de las levaduras *S.cerevisiae* (*Sc*), *K. marxianus* (*Km*) y *T. delbrueckii*(*Td*) utilizando ARISA en medio sintético (6 hs). Teniendo en azul la región 26S y en verde la región ITS.



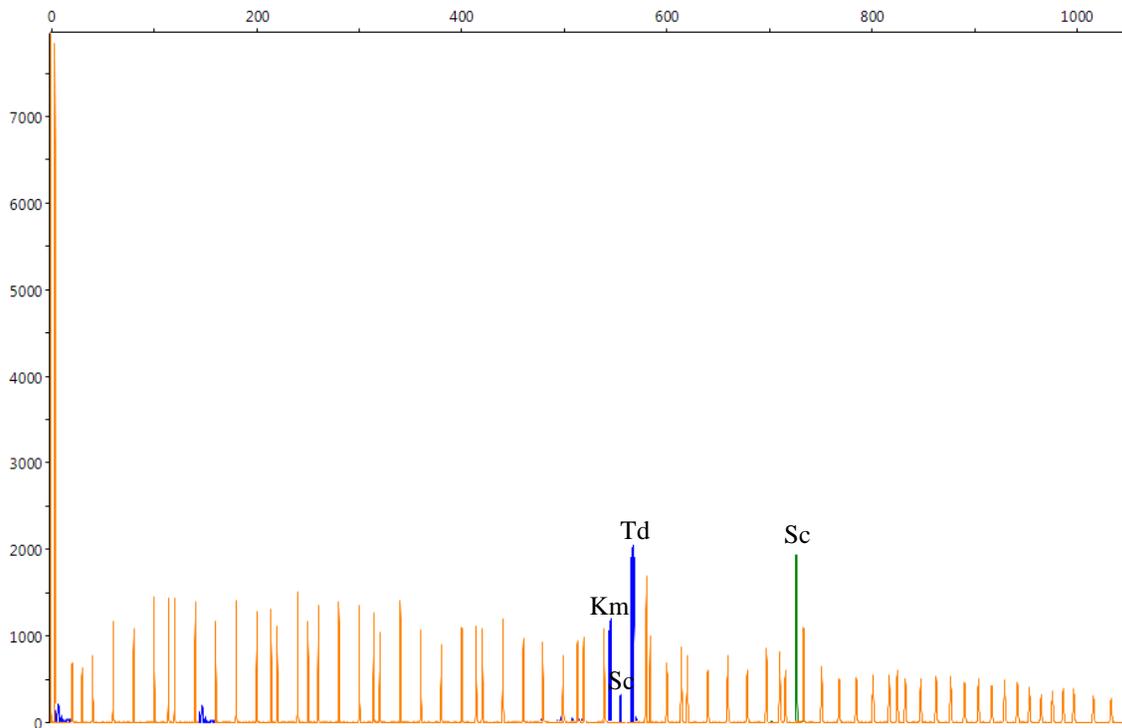
Electroferograma obtenido de las levaduras *S.cerevisiae* (*Sc*), *K. marxianus* (*Km*) y *T. delbrueckii*(*Td*) utilizando ARISA en medio sintético (12 hs). Teniendo en azul la región 26S y en verde la región ITS.



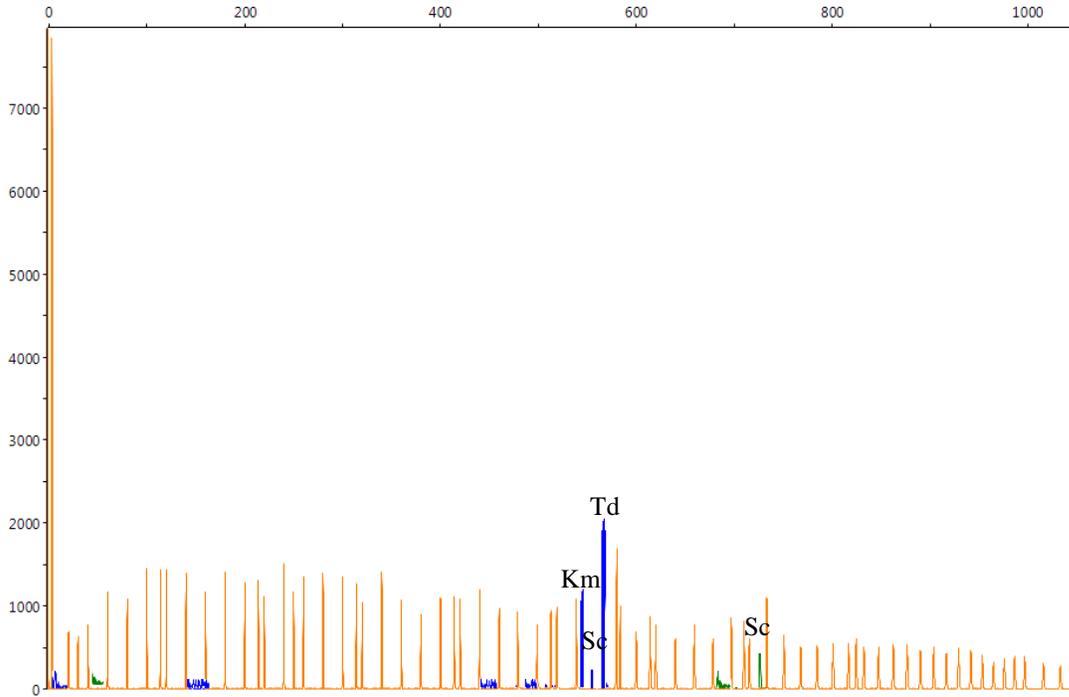
Electroferograma obtenido de las levaduras *S.cerevisiae* (*Sc*), *K. marxianus* (*Km*) y *T. delbrueckii*(*Td*) utilizando ARISA en medio sintético (24 hs). Teniendo en azul la región 26S y en verde la región ITS.



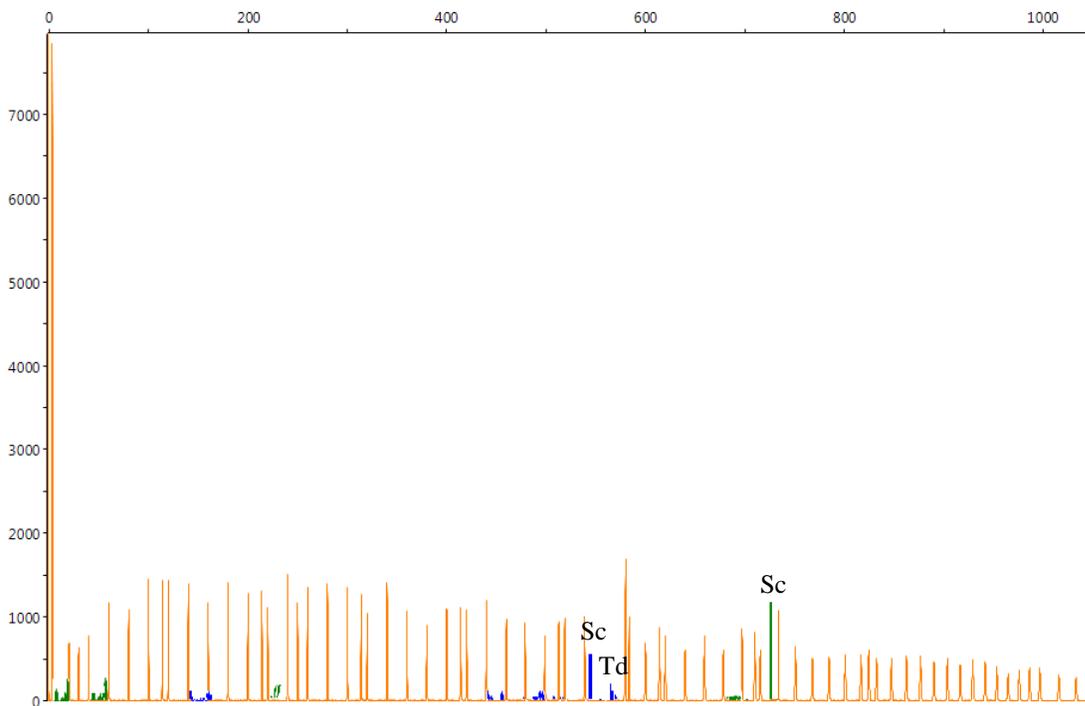
Electroferograma obtenido de las levaduras *S.cerevisiae* (*Sc*), *K. marxianus* (*Km*) y *T. delbrueckii*(*Td*) utilizando ARISA en medio sintético (48 hs). Teniendo en azul la región 26S y en verde la región ITS.



Electroferograma obtenido de las levaduras *S.cerevisiae* (*Sc*), *K. marxianus* (*Km*) y *T. delbrueckii*(*Td*) utilizando ARISA en medio sintético (60 hs). Teniendo en azul la región 26S y en verde la región ITS.

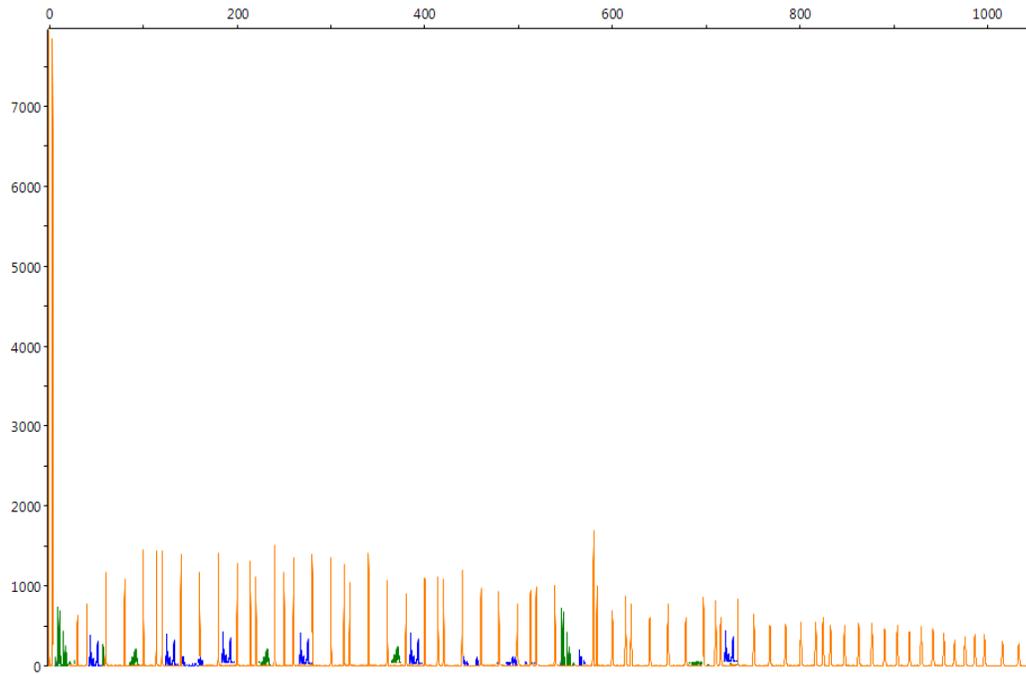


Electroferograma obtenido de las levaduras *S.cerevisiae* (Sc), *K. marxianus* (Km) y *T. delbrueckii*(Td) utilizando ARISA en medio sintético (84 hs). Teniendo en azul la región 26S y en verde la región ITS.

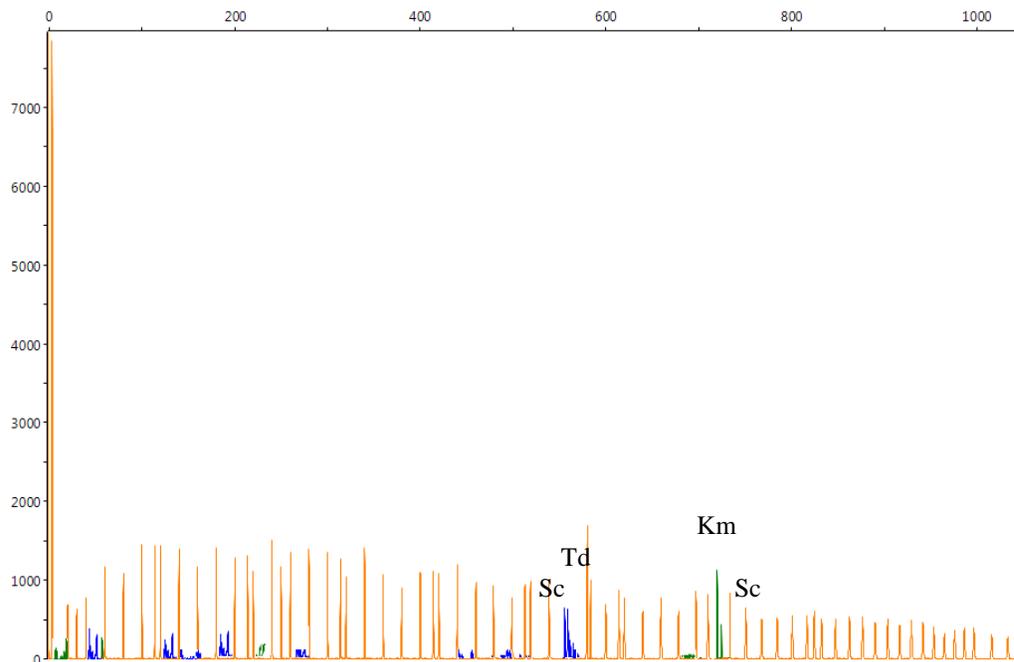


Electroferograma obtenido de las levaduras *S.cerevisiae* (Sc), *K. marxianus* (Km) y *T. delbrueckii*(Td) utilizando ARISA en medio sintético (120 hs). Teniendo en azul la región 26S y en verde la región ITS.

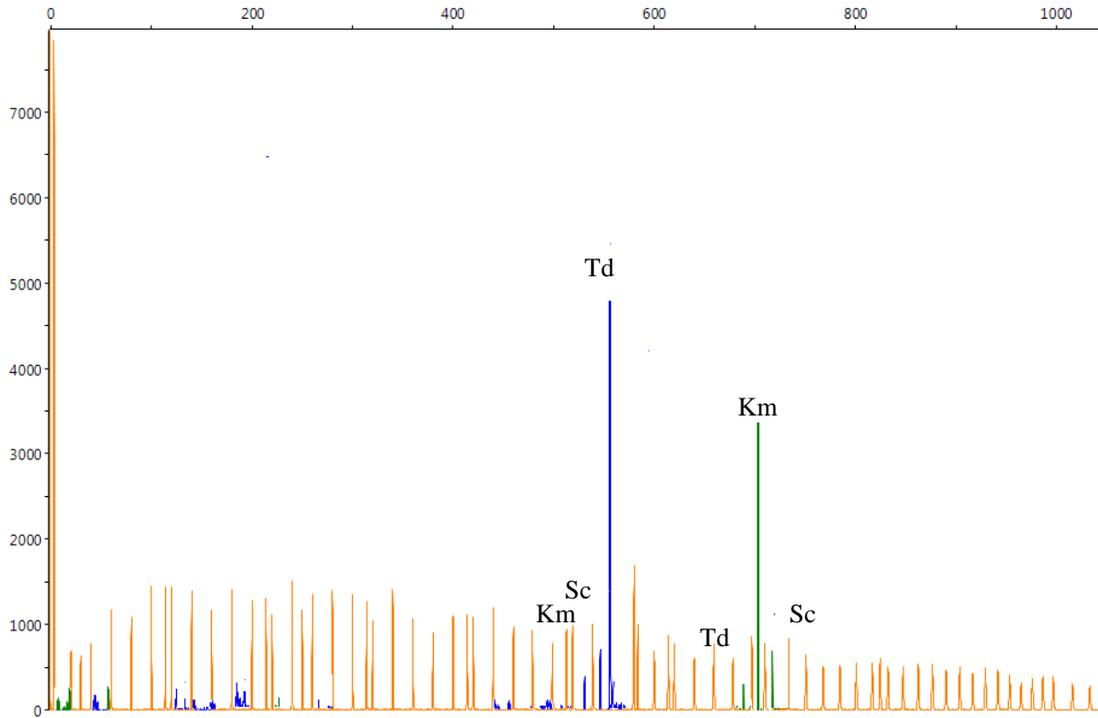
Apéndice 9 Electroferogramas obtenidos de las levaduras utilizadas en este estudio durante el seguimiento de la dinámica poblacional utilizando ARISA en medio de mosto.



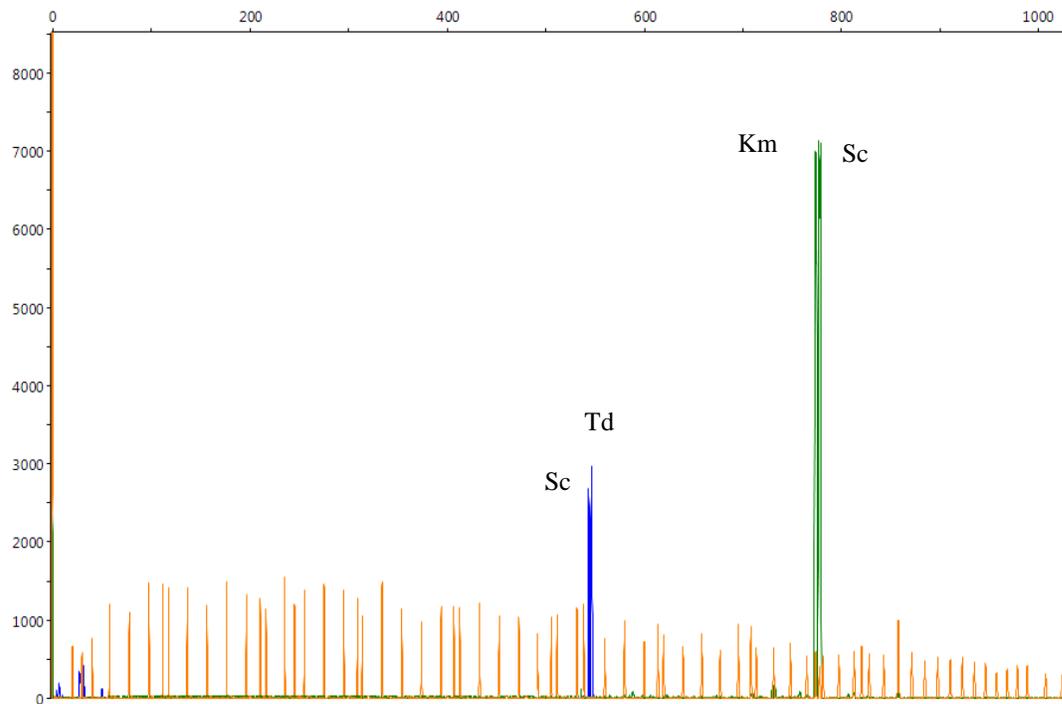
Muestra de las 0 a 24 hs.



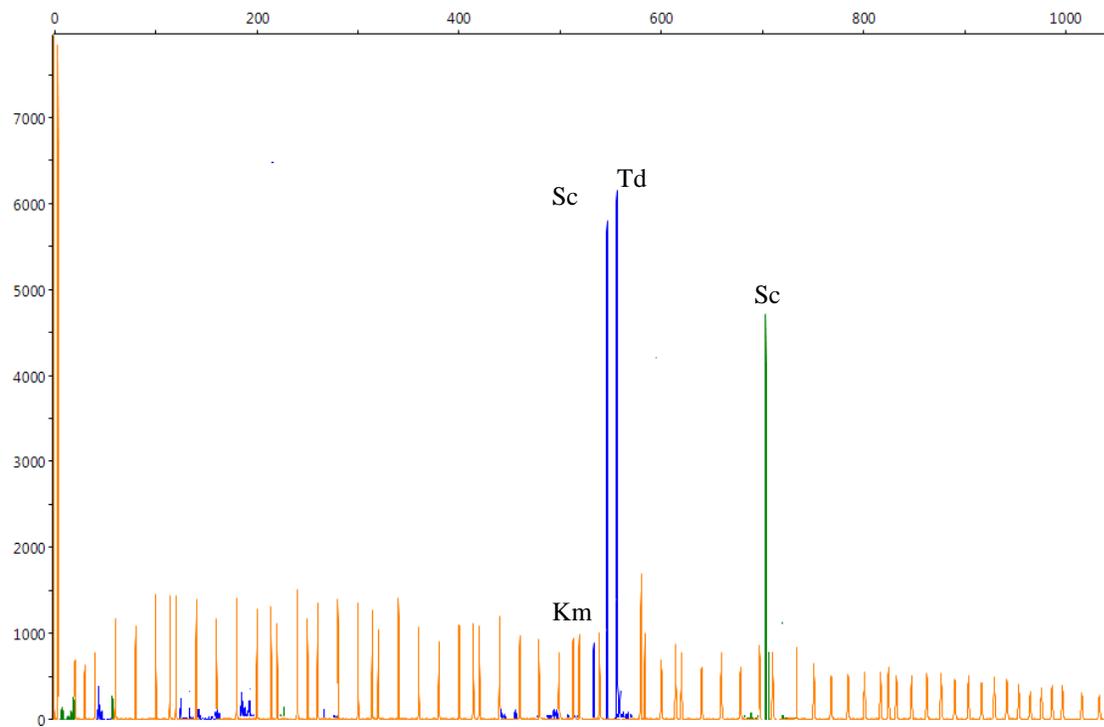
Electroferograma obtenido de las levaduras *S.cerevisiae* (*Sc*), *K. marxianus* (*Km*) y *T. delbrueckii*(*Td*) utilizando ARISA en medio de mosto (48 hs). Teniendo en azul la región 26S y en verde la región ITS.



Electroferograma obtenido de las levaduras *S.cerevisiae* (Sc), *K. marxianus* (Km) y *T. delbrueckii*(Td) utilizando ARISA en medio de mosto (60 hs). Teniendo en azul la región 26S y en verde la región ITS.

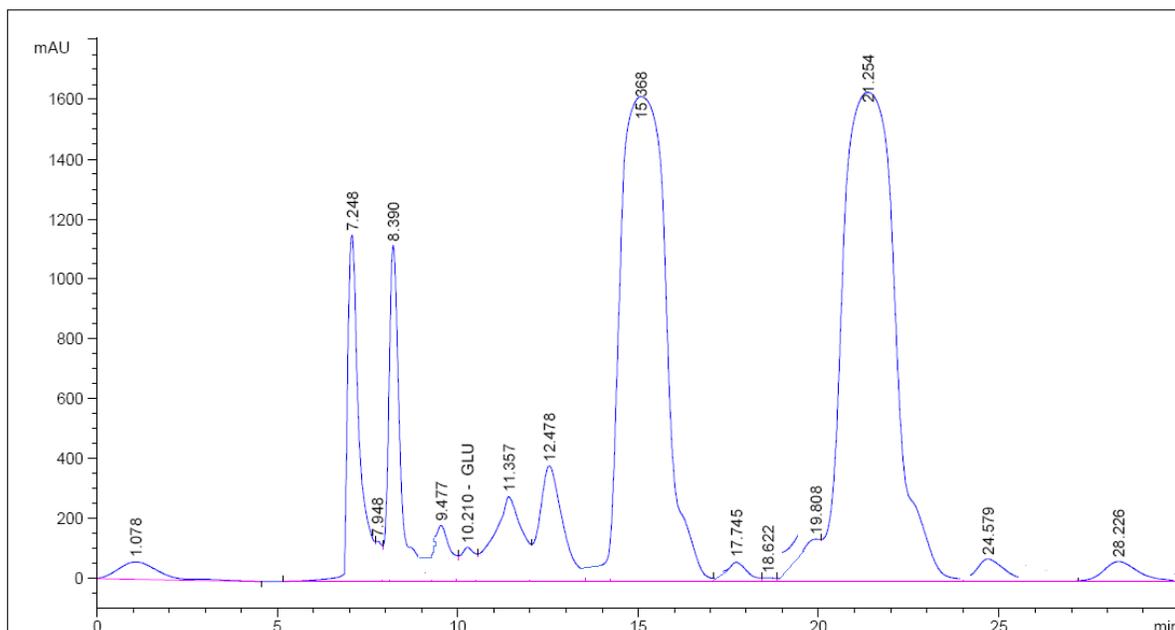


Electroferograma obtenido de las levaduras *S.cerevisiae* (Sc), *K. marxianus* (Km) y *T. delbrueckii*(Td) utilizando ARISA en medio de mosto (84 hs). Teniendo en azul la región 26S y en verde la región ITS.



Electroferograma obtenido de las levaduras *S.cerevisiae* (*Sc*), *K. marxianus* (*Km*) y *T. delbrueckii*(*Td*) utilizando ARISA en medio de mosto (120 hs). Teniendo en azul la región 26S y en verde la región ITS.

Apéndice 10 Cromatograma de HPLC del medio de mosto.



En la imagen se observan los diferentes picos arrojados por el HPLC al analizar una muestra de mosto con una dilución de 1:100 en agua milliQ estéril. Podemos apreciar además los tiempos de retención y con ello los picos de glucosa, fructosa, glicerol y etanol además de otros que suelen ser diferentes ácidos orgánicos. Observando la muestra y tomando en cuenta la dilución realizada se aprecia claramente la infinidad de compuestos que contiene el mosto del agave y es de resaltar el alto contenido de glicerol que aparece en la muestra, que no corresponde a un valor real (estaría en el orden de de concentración de kg por L), haciendo imposible la cuantificación de dicho metabolito por ésta técnica.

GLOSARIO

ADN. Acido desoxirribonucleico: ácido nucléicos formado por nucleótidos en los que el azúcar es desoxirribosa, y las bases nitrogenadas son adenina, timina, citosina y guanina. Excepto en los retrovirus que tienen ARN, el ADN codifica la información para la reproducción y funcionamiento de las células y para la replicación de la propia molécula de ADN. Representa la copia de seguridad o depósito de la información genética primaria, que en las células eucarióticas está confinada en la caja fuerte del núcleo.

Acido nucléico. Biomolécula formada por macropolímeros de nucleótidos, o polinucleótidos. Está presente en todas las células y constituye la base material de la herencia que se transmite de una a otra generación. Existen dos tipos, el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN).

Bioedit. Es un programa informático de secuencias el cual permite la manipulación y análisis de múltiples secuencias y contiene aplicaciones que facilitan su alineamiento.

BLAST. Es un programa informático que emplea un algoritmo heurístico lleva a cabo un alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN o de proteínas. El programa es capaz de comparar una secuencia problema (también denominada en la literatura secuencia *query*) contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren en una base de datos.

Cepa. Es un grupo de aislamientos caracterizados de un microorganismo. Esencialmente esto se aplica a aislamientos del laboratorio, cultivos o selección, raza, variedad.

Destilación. La destilación es el procedimiento más utilizado para la separación y purificación de líquidos, y es el que se utiliza siempre que se pretende separar un líquido de sus impurezas no volátiles.

Diversidad. La variación entre las especies, es lo que les ha permitido a las poblaciones adaptarse a cambios climatológicos, así como a diferentes condiciones ambientales, la existencia de una amplia variedad de especies (diversidad de especies) de plantas, animales y microorganismos en su hábitat natural, o en comunidades con un particular medio ambiente (diversidad ecológica) o bien variaciones genéticas entre las especies (diversidad genética).

Electroforesis. Migración de partículas a través de una matriz polimérica bajo un gradiente de campo eléctrico.

Electroforesis en geles de agarosa. Electroforesis que se lleva a cabo en un gel de agarosa y se emplea para separar moléculas de ADN de entre 100 y 50kb en longitud. La migración del ADN en geles de agarosa depende de su tamaño y de la forma o arreglo de las moléculas.

Electroforesis en geles de poliacrilamida. Técnica mediante el cual fragmentos de ADN se movilizan y separan gracias a una corriente aplicada a través de un gel, el cual está compuesto por una molécula de acrilamida con enlaces transversales que forman una criba molecular. Este tipo de electroforesis tiene una mejor resolución.

Etanol. Es un alcohol que se presenta como un líquido incoloro e inflamable con un punto de ebullición de 78.5°C. Al mezclarse con agua en cualquier proporción, da una mezcla azeotrópica. Su fórmula química es $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$, principal producto de las bebidas alcohólicas como el vino (un 15% aproximadamente), la cerveza (5%) o licores (hasta un 50%).

Fermentación. Conversión biológica anaeróbica (sin oxígeno) de las moléculas orgánicas, generalmente hidratos de carbono, en alcohol, ácido láctico y gases, mediante la acción de ciertos enzimas que actúan bien directamente o como componentes de ciertas bacterias y levaduras. En su uso más coloquial, el término hace referencia a menudo a bioprocesos que no están estrictamente relacionados con la fermentación.

Fermentación alcohólica. Es un proceso biológico de fermentación en ausencia de aire originado por la actividad de microorganismos que procesan los hidratos de carbono para obtener como productos finales el etanol dióxido de carbono en forma de gas y ATP.

Fermentación maloláctica. Es el proceso por el cual el ácido málico presente en las frutas se transforma químicamente en ácido láctico; por medio de bacterias de origen láctico existentes de forma natural en el entorno, o en el interior de la fruta misma.

Fructosa. Es una forma de azúcar encontrada en las frutas y en la miel. Es un monosacárido con la misma fórmula empírica que la glucosa pero con diferente estructura.

Glucosa. Es un monosacárido con fórmula empírica $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, la misma que la fructosa pero con diferente posición relativa de los grupos -OH y O= . Es una hexosa, es decir, que contiene 6 átomos de carbono, y es una aldosa, esto es, el grupo carbonilo está en el extremo de la molécula. Es una forma de azúcar que se encuentra libre en las frutas y en la miel.

HPLC. Cromatografía líquida de alta eficiencia emplea una fase móvil que es un líquido que fluye a través de una columna que contiene una fase líquida

Levadura. Hongos microscópicos unicelulares que son importantes por su capacidad para realizar la fermentación de hidratos de carbono, produciendo distintas sustancias.

Metagenoma. Es el ADN de un consorcio microbiano compuesto de varios genomas que corresponden a diversos microorganismos.

Mezcal. Del nahuatl metl e Izcalli que significa agave cocido al horno. Es una bebida alcohólica tradicional mexicana a base de agave.

Mosto. Sustrato donde se lleva a cabo la fermentación de las bebidas alcohólicas. Compuesto de azúcares tales como glucosa y fructosa, además de ácidos orgánicos, tales como ac. acético, ac. láctico, ac. málico, ac. succínico, ac. cítrico. Y alcoholes tales como etanol y metanol, la materia orgánica puede variar de acuerdo al tipo de bebida que se elabore, en el caso del mezcal se emplea el agave. Y en el caso de los vinos se emplea la uva.

Oligonucleótido. Secuencia de ácido nucleico o de una molécula relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del ADN.

Propiedades organolépticas. Son el conjunto de descripciones de las características físicas que tiene la materia en general, como por ejemplo su sabor, textura, olor, color. Todas estas sensaciones producen al comer una sensación agradable o desagradable.

Pares de base. Dos nucleótidos opuestos y complementarios en las cadenas de ADN y ARN que están conectadas por puentes de hidrógeno.

PCR. Reacción en Cadena de la Polimerasa. Técnica de análisis del genoma mediante la amplificación ilimitada de porciones específicas del ADN. Es un método revolucionario de amplificación exponencial del ADN por la intervención de una enzima termoestable, la *Taq* polimerasa, inventado por el americano Kary Mullis en 1985.

Secuencia de ADN. Orden de encadenamiento de las bases nitrogenadas de los nucleótidos que constituyen el ADN y que cifra toda la información genética. Cuando es codificante (exón), define el orden de los aminoácidos que forman la proteína correspondiente.

SSCP. Es un proceso donde los productos de PCR son desnaturalizados en cadena simple de ADN, luego renaturalizados para favorecer los apareamientos intracatenarios y finalmente analizados en un gel de poliacrilamida. La estructura de ADN adoptará una conformación y permitirá la diferenciación en el gel.

Taq ADN polimerasa. Es una enzima que se extrae de la bacteria *Thermus aquaticus* para la replicación del ADN, es ampliamente utilizada por sus propiedades de termorresistencia en las reacciones de PCR.

Trapiche. Es un molino artesanal utilizado para extraer el jugo de plantas tales como la caña de azúcar y el agave.